N° D'ORDRE
91

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JANINE DUTRIEU

pharmacien
ancien interne des hôpitaux
licenciée es sciences

1re THÈSE. — OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT D'*Artemia salina* LEACH.

2e THÈSE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 Mai 1960 devant la Commission d'examen.

M. LAFON, *Président.*

MM. BOUNHIOL, CAMBAR } *Examinateurs.*

PARIS

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

13, QUAI ANATOLE-FRANCE, 13

—

1960

N° D'ORDRE
91

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JANINE DUTRIEU

pharmacien
ancien interne des hôpitaux
licenciée es sciences

1re THÈSE. — OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT D'*Artemia salina* LEACH.

2e THÈSE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 Mai 1960 devant la Commission d'examen.

M. LAFON, *Président.*

MM. BOUNHIOL, CAMBAR, *Examinateurs.*

PARIS

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

13, QUAI ANATOLE-FRANCE, 13

—

1960

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Doyen : M. BRUS.

Doyens honoraires : MM. CHAINE, MERCIER.

Professeurs honoraires :

MM. DAURE, Recteur de l'Académie de Caen.
CHAINE.
KASTLER, Professeur à la Sorbonne.
MM. QUELET, Professeur à la Sorbonne.
PISOT, Professeur à la Sorbonne.
Mlle JOSIEN, Professeur à la Sorbonne.

Professeurs :

MM. MERCIER, Radioélectricité.
DANGEARD, Botanique.
GENEVOIS, Chimie biol. et Physiol. Végét.
MILLOUX, Calcul infinitésimal.
CAU, Physique expérimentale.
BRUS, Chimie.
AVEL, Zoologie et physiologie animale.
ROUSSET, Physique générale.
ROGER, Mécanique rationnelle.
WEILL, Anatomie comparée et Embryogénie.
DUFRESNOY, Mathématiques générales.
LAFON, Physiologie générale.
BOUNHIOL, Biologie animale.
SERVANT, Physique.
CALAS, Chimie organique.
GAY, Minéralogie.
LAMARE, Géologie.
MM. PACAULT, Chimie physique.
SCHŒLLER, Géologie.
DAVID, Biologie végétale.
COLMEZ, Méthodes Math. de la Physique.
CAMBAR, Biologie animale.
VIGNEAUX, Géologie.
RIBEREAU-GAYON, Œnologie et chimie agricole.
RISS, Mathématiques.
GUISONNIER, Physique.
ALLARD, Chimie.
PATY, Chimie.
SECHET, Botanique.
HAGET, Zoologie expérimentale.
BORDES, Anthropologie et préhistoire.
CREAC'H, Biologie animale.
HOARAU, Chimie physique.
LAFARGUE, Physique.
N. Chimie minérale.

Maîtres de conférences honoraires : M. DE PUYMALY.

Maîtres de conférences :

MM. DOLBEAULT, Mathématiques.
LALANDE, Chimie appliquée.
LOUDETTE, Physique M.P.C.
SOURISSEAU, Chimie M.P.C. S.P.C.N.
CHASTEL, Physique corpusculaire.
MARCHAND, Chimie.
RUAMPS, Physique électronique.
EYME, Botanique.
MAURET, Chimie.
Mme TISON, Calcul des probabilités.
MM. GOURDIN, Physique théorique.
MM. FRAINNET, Chimie.
VALENTIN, Physique.
BLONDEL, Mathématiques M.P.C.
CLASTRE, Cristallographie physique.
LEMANCEAU, Chimie.
PEREZ Y JORDA, Physique P.C.B. S.P.C.N.
Mme BLANCHETON, Mathématiques.
N. Physique théorique.
N. Géologie approfondie.

Secrétaire principal : M. ARTIGUELONG.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT D'*ARTEMIA SALINA* LEACH

PAR

JANINE DUTRIEU

(Laboratoire de Physiologie générale de la Faculté des Sciences de Bordeaux).

SOMMAIRE

INTRODUCTION 3

MÉTHODES D'ÉLEVAGE 5

PREMIÈRE PARTIE. — L'ŒUF DURABLE ET SON ÉCLOSION

Chapitre I. — OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES 13

Techniques 16
Résultats 18

Chapitre II. — OBSERVATIONS PHYSIOLOGIQUES 23

La diapause 23
L'anhydrobiose 26
L'éclosion : description, conditions externes 28

Chapitre III. — OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES 34

Techniques générales 35

A. — L'œuf en anhydrobiose 38
1° Importance relative de l'embryon et de la coque 38
2° La coque 41
3° L'œuf total 46
4° Composition de l'embryon 64

B. — L'œuf en immersion 65
1° Pénétration des ions 66
2° Utilisation des réserves 68
3° Consommation d'oxygène et quotient respiratoire 70

C. — Le nauplius à l'éclosion 74
1° Pesée et teneur en eau 75
2° Composition chimique 77
3° Consommation d'oxygène et quotient respiratoire 81
4° Résumé de la composition du nauplius 81

D. — Conclusions générales sur le métabolisme de l'embryon 82

DEUXIÈME PARTIE. — RECHERCHES SUR LES VARIATIONS DU MÉTABOLISME ET DU MODE DE REPRODUCTION DE L'ADULTE EN FONCTION DES FACTEURS EXTERNES

Chapitre IV. — LA COMPOSITION DE L'ORGANISME ADULTE EN FONCTION DES VARIATIONS DE LA SALANITÉ 87

A. — Constituants principaux 87

B. — Les pigments 91
Nature 93
Origine 100

Chapitre V. — CONDITIONS D'APPARITION DE L'OVIPARITÉ ET DE LA VIVIPARITÉ 105

1° Méthodes d'étude 106
2° Observations 108
3° Discussion et conclusions 112

Chapitre VI. — LA RESPIRATION 118

1° Consommation d'O_2 en fonction de la salinité chez les mâles 119
2° Consommation d'O_2 en fonction de la présence d'hémoglobine et du sexe 121

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 122

BIBLIOGRAPHIE 128

AVANT-PROPOS

Monsieur le Professeur FAGE m'a fait l'honneur de bien vouloir présenter mes notes préliminaires à l'Académie et faire paraître dans les *Archives de Zoologie expérimentale et générale* l'exposé de cette thèse ; qu'il me permette de lui adresser mes remerciements très respectueux.

C'est avec un bien vif et bien sincère sentiment de reconnaissance que je remercie Monsieur le Professeur LAFON ; après m'avoir donné le sujet de cette thèse, il m'a toujours aidée, avec la profonde bonté qui lui est coutumière, tant par ses conseils que par le matériel qu'il a toujours mis très abondamment à ma disposition. Je le remercie également pour son enseignement de la Physiologie dont la qualité m'a incitée, voici quelques années, à lui demander de travailler dans son laboratoire.

Je prie Monsieur le Professeur BOUNHIOL et Monsieur le Professeur CAMBAR d'accepter mes remerciements pour leur bienveillance et l'honneur qu'ils me font en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Que Monsieur le Professeur AVEL trouve ici l'expression de ma réelle

gratitude pour l'attention qu'il portait à mon travail alors que j'étais stagiaire de recherche au C. N. R. S. et qu'il était mon « parrain ».

Je remercie Monsieur le Professeur MATHIAS, doyen de la faculté des Sciences de Montpellier, de m'avoir permis de séjourner à la station de Biologie marine de Sète. Je remercie également Monsieur MEYNIEL, Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de Clermond-Ferrand, de m'avoir donné la possibilité d'utiliser le spectrophotomètre de Monsieur le Professeur BLANQUET, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux. Monsieur LUBET, Maître de Conférences, alors qu'il était sous-directeur de la Station de Biologie Marine d'Arcachon, me donna, avec beaucoup d'amabilité, des conseils très utiles.

Monsieur PIAUD, aide de laboratoire au laboratoire de Physiologie Générale, par son dévouement, a toujours facilité mon travail matériel. Je suis également reconnaissante au personnel du laboratoire de Zoologie, particulièrement à Madame TARDY et à Monsieur ROSPIDE.

INTRODUCTION

Depuis longtemps, la pullulation dans les eaux de très haute concentration saline et dans les marais salants, d'un petit Crustacé à l'aspect fragile, a attiré l'attention des zoologistes. Certains auteurs (PAYEN, 83) ont attribué la couleur rose des marais salants à ce petit animal, *Artemia salina* Leach, dont le corps présente souvent une teinte rose ou rouge ; mais plus tard on a reconnu que cette couleur était due à des algues, les *Dunaliella* (JOLY, 62).

Artemia salina, la crevette des salines, n'est pas une vraie crevette, mais un Crustacé Phyllopode, sous-classe des Branchiopodes, de l'ordre des Anostracés. Elle représente donc une forme très primitive, caractérisée par un système nerveux en échelle, un long cœur tubulaire (GREENE, 55), et des appendices natatoires en forme de feuille. Elle était déjà représentée à l'ère tertiaire (oligocène) et n'a guère évolué depuis.

Le corps, d'une longueur totale de 7 à 8 mm, est divisé en trois parties ; mais, comme il est difficile de distinguer le thorax et l'abdomen, on se contente généralement de distinguer la tête et le tronc. Celui-ci

est divisé en onze somites antérieurs portant les appendices foliacés, deux portant les organes génitaux et six autres, les derniers, dépourvus d'appendices.

Le genre *Artemia* se trouve largement réparti dans les salines du monde entier : on en trouve sous tous les climats, mais plus particulièrement dans les régions chaudes et sèches. On attribue souvent cette spécialisation de l'habitat à la sélection naturelle, les *Artemia* ayant trouvé refuge dans un milieu où leurs ennemis ne peuvent vivre.

Cette adaptation à des salinités élevées a d'abord attiré l'attention des zoologistes par les modifications somatiques qui l'accompagnent : ce sont les travaux de Smankewitsch (89, 90), contredits dans leurs conclusions génétiques par Artom (1) puis Daday. Les variations d'*Artemia* ont continué à être étudiées par la suite (Gajewski) en rapport d'ailleurs avec toute une série de travaux, dont certains très récents (Artom, Brauer, Gross, Barigozzi, Goldsmith), sont consacrés à l'étude de l'existence d'espèces différenciées par leur structure chromosomique ; il existe en effet des espèces diploïdes et polyploïdes, triploïdes, tétraploïdes, pentaploïdes et peut-être octoploïdes. Plusieurs de ces espèces possèdent des représentants bisexués et parthénogénétiques dont la répartition géographique paraît assez stricte. Une même espèce est toujours ou bisexuée, ou parthénogénétique et les œufs bisexués ne peuvent se développer qu'après fécondation ; on n'observe pas chez *Artemia* l'alternance de bisexualité et de parthénogénèse présentée par les Daphnies. Nombreux sont les travaux consacrés à la division de l'œuf parthénogénétique et de l'œuf fécondé (Brauer, Gross, Artom).

Une autre série de travaux, beaucoup plus récents d'ailleurs, est consacrée à la pénétration et à l'antagonisme des ions, et à la régulation osmotique (Medwedewa, Martin et Wilbur ; Warren, Kuenen, Baas Becking ; Baas Becking, Karstens, Kanner ; Groghan ; Plattner ; Sparrow).

Une autre particularité caractérise *Artemia salina*, l'amphigonie : la femelle, qu'elle soit d'une race bisexuée ou parthénogénétique, peut se reproduire suivant deux modes différents ; tantôt elle pond des nauplius vivants, elle est alors vivipare, tantôt elle pond des œufs ; ces œufs sont souvent en diapause et n'éclosent qu'après avoir subi une dessiccation. En outre, ces œufs, desséchés, peuvent être conservés pendant de nombreuses années sans perdre le pouvoir de donner un nauplius.

Les travaux faits sur *Artemia* portent donc essentiellement sur la

cytologie et la génétique d'une part, et sur l'antagonisme des ions d'autre part. Comme la biochimie n'avait pas été étudiée, ce travail lui est en majeure partie consacré ; cependant, signalons dès à présent, le récent travail histochimique de FAUTREZ FIRLEFYN et le travail encore plus récent, sur les enzymes de l'œuf durable au moment de l'éclosion, d'URBANI et de BELLINI.

Dans une première partie, j'exposerai l'étude de l'œuf durable, puis, dans une deuxième partie, la biologie de l'adulte en essayant de définir les causes de l'oviparité et de la viviparité.

MÉTHODES D'ÉLEVAGE

D'après beaucoup d'auteurs, l'élevage artificiel d'*Artemia salina* serait aisé en laboratoire. Si cela est vrai pour de petites quantités, il n'en est pas de même quand on veut obtenir un grand nombre d'animaux en bon état. Comme c'était le cas pour ce travail, j'ai été obligée, avant de mettre des élevages en train, d'examiner en détail différents facteurs. Ce sont, par ordre d'importance croissante : 1° l'éclairage ; 2° la salinité ; 3° la température ; 4° la nourriture ; 5° l'oxygénation.

Ces élevages ont été faits à partir d'œufs durables du commerce, désséchés, en provenance de Californie, appartenant à la race bisexuée diploïde.

L'éclairage.

La réaction d'*Artemia salina* à la lumière est remarquable (SEIFERT, 87, 88). Chez l'adulte, la position de nage est curieuse : l'animal se déplace sur le dos, la face ventrale tournée vers le haut ; cela est dû au fait qu'il tourne cette face vers la lumière ; on peut redresser la nage en plaçant une source lumineuse au fond de l'aquarium : ce fait, signalé par LOCHHEAD (71), est facilement vérifiable.

De plus, l'animal est attiré par la source lumineuse. Cela est particulièrement net chez le jeune à l'éclosion. Les adultes, par contre, semblent parfois fuir une lumière trop forte. Leur optimum de photosensibilité est sans doute plus bas que chez le jeune. Ils n'en sont pas moins attirés fortement par une source lumineuse d'intensité moyenne. En conséquence, dans les élevages, les animaux se rassemblent dans

les parties de l'aquarium les mieux éclairées. Ce phénomène a un rôle indirectement important. En effet, si l'éclairage est localisé dans une partie réduite de l'aquarium, tous les animaux se groupent en cet endroit, d'où encombrement et asphyxie, et l'élevage est rapidement décimé. Cela est facilement visible dans les élevages de très jeunes animaux (métanauplius). Chez les adultes, les mouvements de nage étant beaucoup plus amples, le phénomène leur est moins néfaste.

Pratiquement, il est bon de placer une lampe au-dessus de l'aquarium ; les animaux se groupent en surface, mais la dispersion et l'aération sont beaucoup plus importantes que lorsqu'ils se groupent dans un angle, vers la lumière provenant d'une fenêtre par exemple.

La salinité.

Les *Artemia* sont caractérisées par leur pouvoir d'adaptation à des milieux salins de concentration et de composition très variables. Il est donc très facile d'obtenir une eau d'élevage convenable. Certains auteurs se contentent d'une solution de sel marin dont la concentration peut être très variable (de 30 °/oo à 80 °/oo suivant les auteurs). Personnellement, j'ai préféré utiliser soit de l'eau de mer naturelle, additionnée de sel marin (15 °/oo par litre d'eau de mer), soit une solution saline de composition proche de l'eau de mer mais enrichie en Cl Na) :

Cl Na	40 g.
Cl_2 Mg	5
SO_4 Na_2	2,5
Cl K	0,6
Cl_2 Ca	1
CO_3H Na	0,2
Br K	0,1
BO_3 H_3	0,4
Eau	q. s. p. 1 litre

Tableau

	Eau de mer pure	Eau de mer + 15 °/oo de Cl Na	Eau de mer + 25 °/oo de Cl Na
Cl g/litre	22	32	37
Cl Na correspondant	36	53	60

Les deux solutions donnent également de bons résultats. Expérimentalement, j'ai utilisé des eaux de mer de salinités variées obtenues par surcharge en Cl Na. Je n'ai pas utilisé d'eaux sursalées obtenues par évaporation.

Dans le tableau I sont réunies les diverses eaux utilisées, avec leur taux de Cl, dosé par la méthode chimique et le taux correspondant en sel exprimé en Cl Na.

La température.

Maximum : D'après Mathias (75), les *Artemia* supportent facilement une température de 37°, et 50 % résistent à 40°. Elles peuvent vivre indéfiniment au-dessous de 36°. Cependant, d'après mes élevages, il me paraît préférable de ne jamais dépasser une température continuelle de 30°-32°.

Minimum : Toujours d'après Mathias, *Artemia* ne supporte pas une température inférieure à + 4°. En hiver, on ne trouve pas d'*Artemia* dans les marais salants. Elles commencent à apparaître quand la température est de + 10°, mais ne pullulent qu'à partir de + 20°. Certains de mes élevages ont été bien conservés et se sont bien reproduits pendant quatre mois à la température de + 15°.

Optimun : La température indiquée par de nombreux auteurs pour les élevages est de 25 à 30°. C'est celle que j'ai utilisée, mes élevages étant réglés à 26-28°. Une température de 24°-25° paraît préférable à une température de 28°-30°. Barigozzi (3) a fait d'excellents élevages à 22°.

I.

Eau de mer + 35 ‰ de Cl Na	Eau de mer + 90 ‰ de Cl Na	Eau de mer synthétique	Eau de Sète (marais salants)	
			A	B
41,2	74	27	138	113
67,6	122	45	227	186

La nourriture.

Dans la nature, la nourriture est faite en grande partie d'algues unicellulaires, de Protozoaires, de Bactéries et de détritus finement divisés (Lochhead). Généralement, c'est un Flagellé, le *Dunaliella*, très abondant dans les marais salants, qui constitue la nourriture principale.

L'*Artemia* se nourrit continuellement sans choisir sa nourriture, grâce aux mouvements incessants de ses appendices qui servent également à la natation et à la respiration.

Pour les élevages artificiels, de nombreux aliments ont été proposés : poudre de viande, mie de pain, levure de bière et cultures d'algues (Mathias).

J'ai retenu seulement les cultures d'algues et la levure de bière.

Algues. — J'ai utilisé des cultures de *Chlamydomonas eugametos*.

Technique de culture. — Milieu de culture de Erd-Schreiber :

Eau de mer filtrée	1000 cm³
NO_3 Na	0,2 g.
PO_4H Na_2	0,03
Extrait de sol	50 cm³

Stériliser cette solution par tyndallisation ou, plus simplement, par chauffage de l'eau filtrée à 70°, au moins pendant quatre heures et mieux pendant deux jours ; faire bouillir l'extrait de sol, et ajouter nitrate et phosphate pendant que cet extrait est encore tiède. Ajouter cette solution tiède à l'eau de mer froide (après stérilisation).

Préparation de l'extrait de sol. — Mettre un kg de terre dans un litre d'eau ordinaire. Faire bouillir et conserver l'ébulition pendant 40 minutes. Filtrer et conserver au frigidaire pendant deux jours. Refiltrer. Le liquide doit être très clair et jaune ambré. Conserver au frigidaire.

Repiquer en Erlenmeyers toujours stériles, en fonction du développement de la culture. On peut garder plusieurs mois sans repiquer. Conserver les cultures au soleil, si possible à 18°.

Les cultures d'algues sont toujours introduites en quantité abondante dans les bacs d'élevages. Si la culture est dévorée trop vite, il faut évidemment la renouveler. Si la culture s'entretient et s'accroît,

ce qu'on peut voir après deux ou trois jours, il suffit de renouveler l'eau de temps en temps.

Avantages. — 1° Ce procédé est excellent pour les métanauplius et les jeunes. Il est indispensable pour faire démarrer un élevage quand on ne possède pas déjà d'adultes (pour une raison qui sera donnée bientôt).

2° Il entretient une teneur convenable en oxygène.

Inconvénients. — 1° Les adultes n'ont généralement pas une nourriture suffisante : ils se multiplient peu ; les femelles ont des pontes pauvres, leur mortalité est élevée et les mâles finissent par prédominer dans les élevages.

2° Obligation d'entretenir des cultures de *Chlamydomonas.*

Levure de bière. — On peut utiliser de la levure de bière sèche ou de la levure fraîche de boulangerie. La levure sèche est la plus pratique : aussi, je l'ai presque exclusivement utilisée.

Inconvénients. — Cette nourriture convient très mal aux nauplius et aux métanauplius ; il est extrêmement hasardeux de faire partir un élevage en utilisant de la levure sèche ; la levure fraîche de boulangerie convient un peu mieux, car elle se disperse très finement dans l'eau. En tout cas, il est bien préférable de mettre en train un élevage à l'aide d'une culture d'algues.

Avantages. — Si on respecte les conditions d'oxygénation dont je parlerai au paragraphe suivant, la levure desséchée est une excellente nourriture ; elle permet d'obtenir des animaux de belle taille, vigoureux et se reproduisant abondamment.

Pour un bac d'une capacité de 20 litres et contenant 16 à 17 litres d'eau, on peut donner environ 500 mg de levure par jour. L'eau doit rester claire ; si elle se trouble (signe de fermentation et de prolifération bactérienne), il faut arrêter toute addition de nourriture jusqu'à ce qu'elle redevienne parfaitement claire. Si elle reste trouble pendant plus de quatre jours, il convient de la changer.

J'ai utilisé les deux modes de nourriture, algues et surtout levure. Cela m'a permis de faire des comparaisons se rapportant à la détermination de l'oviparité et de la viviparité sur lesquelles je reviendrai plus tard.

Oxygénation.

Dans les conseils donnés par les auteurs, aucune mention particulière n'est consacrée à l'oxygénation.

Dans le cas de l'utilisation des algues, il est évident que l'oxygénation est inutile, la photosynthèse étant suffisante.

Par contre, la question est capitale si on utilise de la levure.

Bien qu'*Artemia* soit capable de s'adapter à des milieux très pauvres en oxygène (elle survit de un à cinq jours dans l'eau qui a été bouillie pendant 45 minutes), il est certain que pour obtenir de beaux élevages, il faut lui fournir un minimum d'oxygène. Or le fait de les nourrir avec de la levure de bière abaisse considérablement le taux d'oxygène du milieu : au bout de quelques heures, ce taux est pratiquement nul. Des dosages systématiques de l'oxygène dissous par la méthode de Nicloux le montrent clairement : une eau de mer additionnée de 15 ‰ de Cl Na, fraîche, contient 3,5 cm^3 d'O_2/litre d'eau ; la même eau additionnée de levure n'en contient plus que 0,35 au bout de 24 heures, et plus du tout au bout de 5 à 6 jours. Additionnée d'une culture d'algues, elle en contient 4 à 4,4 cm^3/litre d'une façon à peu près constante. Une eau de mer additionnée de 90 ‰ de Cl Na en contient 2,5 à 2,8 et l'eau de Sète seulement 1,5 à 2,2.

Aussi, il faut oxygéner artificiellement le milieu. Le procédé le plus simple consiste à établir un système de barbotage semblable à ceux utilisés dans les aquariums à poissons. Mais cette méthode a le gros inconvénient de mettre en suspension les résidus de nourriture et, éventuellement, les cadavres, qui se rassemblent normalement au fond de l'aquarium. De plus, les *Artemia* semblent supporter assez mal les courants continuels.

J'ai donc adopté la méthode suivante : chaque jour, je fais barboter, à 5 cm environ de la surface de l'eau, un courant d'oxygène pur pendant une à deux minutes. Cette méthode m'a donné d'excellents résultats. J'ai essayé, sur quelques bacs témoins d'arrêter cette oxygénation : au bout de cinq à six jours, les animaux commencent à mourir d'une façon massive, d'autant plus rapidement, évidemment, que l'élevage est riche en *Artemia* ; deux jours plus tard, il n'y a pratiquement pas de survivants.

Renouvellement de l'eau. — Il faut renouveler l'eau tous les 15 à 20 jours, quelquefois plus souvent. Cela dépend de la quantité de nourriture donnée, du nombre d'animaux présents, de la température, etc... L'eau doit rester claire. Si elle devient trouble et si ce trouble persiste plus de quatre jours, il faut changer l'eau rapidement.

Au moment du renouvellement de l'eau, il faut veiller à ce que la température de l'eau nouvelle soit à peu près la même que celle de l'ancienne.

Mise en train d'un élevage. — Dans un cristallisoir, on place un à deux grammes d'œufs durables du commerce, dans deux à trois litres d'eau de mer. On chauffe vers 25° à l'aide d'une lampe. Au bout de 24 à 48 heures, les œufs éclosent ; les nauplius se groupent à l'endroit le plus éclairé d'où ils sont facilement aspirés à l'aide d'une pipette, puis placés dans un bac d'élevage ; on élimine ainsi les coques inutiles. Deux cas se présentent alors :

1° Si on ne possède pas encore d'adultes on ensemence le bac avec des *Chlamydomonas* ;

2° Si on possède déjà un élevage d'adultes on se contente d'additionner celui-ci de nauplius nouvellement éclos. On entretient ainsi les élevages par des additions répétées de jeunes. Cela est d'autant plus indispensable et doit être fait d'autant plus fréquemment que les quantités d'adultes prélevées en vue de l'expérimentation sont plus importantes.

Dans les conditions d'élevages qui viennent d'être décrites, la maturité sexuelle est atteinte environ trois semaines après l'éclosion. Les animaux sont encore de petite taille et continuent leur croissance par la suite. En général, la durée de vie est de quelques mois, quatre à cinq environ.

Les élevages ont été faits dans des aquariums en verre et en zinc, d'une capacité de 20 litres, facilement maniables. Le chauffage est assuré par des résistances montées sur thermostats, l'éclairage par une rampe de lampes. Il est indispensable de repeindre ou de revernir fréquemment aquariums et thermostats afin d'éviter l'attaque par l'eau de mer ; pour la même raison, il est préférable d'utiliser des résistances chauffantes revêtues de verre.

PREMIÈRE PARTIE

L'ŒUF DURABLE ET SON ÉCLOSION

Les femelles d'*Artemia salina* (races bisexuées ou parthénogénétiques) sont amphigoniques : tantôt elles donnent naissance à des nauplius nageant activement, qui ont acquis dans l'ovisac de la mère forme définitive et mouvements ; on peut alors les appeler « vivipares » ; tantôt elles produisent des œufs enveloppés d'une épaisse coque brune : elles sont « « ovipares ».

Lochhead (71) décrit ainsi le processus de la ponte chez la race californienne (utilisée dans le présent travail) :

« Chez la femelle, les ovaires sont longs et tubulaires, situés dans la partie du tronc dépourvue de membres. Chaque ovaire est relié dans sa partie antérieure par un canal à une poche latérale placée dans la partie dorsale de l'ovisac proéminent. Les ovules y mûrissent. Quand les poches latérales sont remplies d'ovules, elles sont généralement facilement visibles mais ce n'est pas toujours le cas. Chaque poche latérale s'ouvre dans la partie médioventrale de l'ovisac. Là, les ovules sont fécondés et commencent leur développement.

« La destinée d'une ponte dépend, peut-être même entièrement, de la nature et de la quantité de sécrétion produite par les glandes coquillières : celles-ci, semblables à des grappes de raisins, s'ouvrent dans l'ovisac. Si la sécrétion est copieuse, de couleur brune, il se produit des œufs à coque épaisse qui restent « dormants » pendant un long temps. Si la sécrétion est un peu moins abondante, les œufs formés ont une apparence très semblable, mais les coques ne sont pas aussi épaisses et ils éclosent peu de jours après la ponte. Si la sécrétion est en petite quantité et incolore, les œufs sont alors entourés seulement d'une fine coque transparente et leur développement est si rapide que ces œufs éclosent et donnent un nauplius avant d'avoir été pondus ».

Les œufs, après avoir été fécondés, restent dans l'ovisac de la mère pendant environ cinq jours et cela quel que soit le destin ultérieur des

embryons. Au bout de ce temps, les œufs ou les nauplius sont rejetés dans le milieu extérieur. Lorsque toute la ponte a été ainsi rejetée, un nouveau lot d'ovocytes passe dans la poche latérale et la femelle est prête pour une nouvelle fécondation.

Nous sommes donc en présence d'embryons qui, tout en étant, semble-t-il, génétiquement semblables, se développent de façons bien différentes. Tantôt le développement ne présente pas d'interruption apparente (s'il y en a une, elle ne peut être que de très courte durée) ; tantôt, l'embryon subit un arrêt (ou tout au moins un ralentissement considérable) dans son développement, arrêt qui peut se poursuivre pendant de longs mois ; cet arrêt, sorte de *diapause*, ne porte aucun préjudice à l'embryon ; bien au contraire semble-t-il, car pendant cette période, il acquiert vis-à-vis de la dessiccation une résistance considérable.

Pourquoi cette différence ? Quels facteurs interviennent d'une part pour arrêter le développement, puis ensuite, au contraire, pour en permettre la reprise et la continuation normale ?

Comme nous l'avons déjà dit, la biochimie d'*Artemia salina* n'a été abordée que d'une façon très fragmentaire. Aussi, est-ce du point de vue biochimique que nous allons étudier l'œuf durable, de la ponte à l'éclosion du nauplius. Au cours de cette étude, il a été intéressant, ou même indispensable, de préciser quelques points d'embryologie et de physiologie.

Dans cette première partie, il sera traité d'abord de la structure, puis de la physiologie et, enfin, de la biochimie de l'embryon.

Chapitre I.

OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES

Il était indispensable de connaître le stade de l'embryon contenu dans les œufs durables soumis à l'analyse et à partir desquels l'étude biochimique de l'éclosion allait être faite.

Si les stades présents étaient très différents, l'analyse biochimique

présenterait beaucoup moins d'intérêt. Or, nous verrons plus loin que les œufs desséchés possèdent la propriété de pouvoir être alternativement immergés, puis desséchés, autant de fois qu'on le désire, sans pour cela perdre leur vitalité. Naturellement, à chaque immersion, à condition qu'elle soit suffisamment longue, il y a reprise du développement. Comme dans la nature, après leur ponte, les œufs ont très probablement subi de telles alternatives et qu'avant de passer dans le commerce, ils ont été lavés à plusieurs reprises, il y a de fortes chances pour qu'ils aient poursuivi, plus ou moins partiellement suivant le cas, leur développement depuis la ponte et qu'ils ne se trouvent pas tous au même stade.

La bibliographie sommaire de cette question montre qu'il en est sans doute ainsi.

D'après Dawidoff (21), les œufs des salines d'Odessa contiennent de jeunes blastules issues d'une segmentation totale.

D'après Lochhead (71), à la ponte, les œufs sont au dernier stade blastule.

Fautrez-Firlefyn, dans un premier travail consacré à une étude histochimique des fluctuations des acides nucléiques au cours de l'embryogénèse, (35), indique que les œufs durables sont pondus au stade de *gastrule avancée*. Dans une publication plus récente (38), elle signale que les œufs durables poursuivraient leur développement dans l'ovisac maternel jusqu'au stade *métanauplius*, conclusion en contradiction avec la précédente, ainsi qu'avec celles de Barigozzi (3) pour qui l'œuf durable donne bien un nauplius simple à l'éclosion.

Le désaccord entre les divers résultats précédents appelait quelques précisions complémentaires.

L'étude morphologique présente aussi un autre intérêt : Lochhead, nous venons de le voir, signale avec insistance combien la nature de la coque doit avoir d'influence dans le devenir de l'embryon. Il est en effet très vraisemblable qu'un embryon pratiquement libre dans l'ovisac ait, avec le milieu maternel, des échanges beaucoup plus importants que ceux de l'embryon enfermé dans une coque épaisse. Aussi, convenait-il de préciser la structure et la composition de cette coque, ainsi que l'ordre d'apparition des différentes enveloppes au cours du développement.

Mathias (75) décrit ainsi la coque de l'œuf durable :

« Les œufs de Phyllopodes sont protégés par deux membranes :

une membrane interne, mince, qui recouvre directement l'œuf et une autre, externe, la coque proprement dite, plus ou moins épaisse : elle comprend trois zones, ainsi que l'a signalé Zograf et comme j'ai pu le constater moi-même sur *Artemia*. La zone externe de la coque est compacte, sans structure nette et prend fortement les colorants. La zone interne a le même aspect que l'externe, mais elle est peu épaisse et appliquée directement sur la membrane interne qui entoure l'œuf.

« La zone moyenne est beaucoup plus épaisse que les deux autres : au contraire de celle-ci, elle ne prend que faiblement les colorants. Elle renferme, chez *Artemia*, plusieurs couches superposées de cavités dont les plus importantes sont au milieu, tandis que les plus petites sont situées contre les zones externes et internes ».

Mathias ne donne aucune indication sur la composition chimique de la coque, ni sur sa formation par l'embryon ou les glandes coquillières maternelles. Notons que ces observations ont été faites sur les *Artemia salina* parthénogénétiques des salins de la région de Sète.

Lochhead (69), par contre, donne une nouvelle description de la coque chez *Artemia salina* de Californie et aussi quelques précisions d'ordre biochimique :

« Après la fécondation, les œufs d'*Artemia salina* restent dans l'ovisac de la mère environ quatre jours. Là, la segmentation commence et la coque de l'œuf est formée. Si les œufs doivent devenir ovipares, la coque est alors épaisse, dure et brune. Deux enveloppes distinctes sont présentes, l'externe pigmentée et épaisse, l'interne non pigmentée et beaucoup plus fine. Pendant le développement, la coque externe apparait la première, étant formée par une sécrétion des glandes coquillières maternelles. Au point de vue chimique, cette coque ressemble à la cuticuline trouvée chez les crustacés supérieurs et les insectes et paraît dépourvue de chitine. La coque interne est sécrétée par l'embryon en développement et est constituée de chitine imprégnée de protéines.

« La plupart des œufs à coque épaisse restent dormants longtemps après avoir été pondus et sont capables de supporter une longue dessiccation. D'autres œufs, cependant d'aspect semblable, éclosent un ou deux jours après avoir été pondus : leur coque est plus fine que celle des précédents.

« Bien différentes sont les membranes formées autour des embryons qui donneront un animal vivipare. Autour de ces embryons, il y a au moins deux membranes fines et transparentes constituées par

de la chitine et de la cuticuline mélangées. La membrane interne est secrétée par l'embryon, l'externe est probablement produite par les glandes coquillières ».

On peut constater :

1° Que les descriptions de la coque par MATHIAS et par LOCHHEAD diffèrent légèrement, MATHIAS divisant l'épaisse coque externe en trois parties, ce que ne fait pas LOCHHEAD ;

2° Seul LOCHHEAD donne une description biochimique des enveloppes ;

3° Il se borne à noter que la coque externe apparaît la première, avant la coque interne, sécrétée par l'embryon, mais il ne donne aucune précision sur la place exacte de cette apparition dans l'embryogénèse. Or, il est certain, comme il a été dit plus haut, que cela peut avoir une très grande importance : l'embryon entouré de cette coque épaisse, se trouve isolé du milieu maternel d'une façon plus ou moins rigoureuse, à un stade encore jeune, alors que dans le cas de la viviparité, il n'en est pratiquement pas isolé, ou, tout au moins, d'une façon bien différente. Aussi, dans ce chapitre, après la description du développement de l'embryon, sera indiqué le mode de formation de la coque.

Techniques.

On peut utiliser l'observation directe du matériel vivant ou l'examen de coupes après coloration.

OBSERVATION DIRECTE. — Elle est possible seulement pour les embryons vivipares. L'ovisac des femelles ayant été dilacéré dans de l'eau de mer, les œufs, qui ne sont pas recouverts d'une coque, peuvent être aisément observés à la loupe binoculaire :

a) au début de la segmentation, l'œuf a l'aspect d'une morule blanchâtre ou grisâtre ;

b) la segmentation se poursuivant, la surface de l'œuf prend un aspect granuleux (stade blastule et gastrule). La couleur est d'un gris bleuâtre ou d'un blanc opaque suivant que l'embryon contient ou ne contient pas de carotiprotides. Enfin, si les caroténoïdes sont très abondants, il peut arriver que l'embryon soit, dès ce stade, jaune plus ou moins pâle ;

c) enfin, après être passé par un stade présentant un aplatissement,

l'embryon s'organise ; il devient alors transparent ; les ébauches des membres deviennent visibles et l'œil médian apparaît.

Cette méthode a l'avantage de permettre l'observation de la survie de l'œuf en dehors de l'ovisac de la mère dans l'eau de mer.

Histologie. — Le but du travail est d'observer : 1° des œufs venant d'être pondus, 2° des œufs du commerce, 3° des œufs du commerce ayant été immergés pendant des temps variables à une température telle qu'ils ont poursuivi leur développement, 4° des poches ovigères de femelles contenant des embryons avec et sans coque et à des stades différents.

L'observation directe n'est pas possible pour les œufs durables : leur coque très épaisse et colorée ne peut être rendue transparente sans détérioration de l'embryon.

Si on cherche à enlever la coque directement sur l'œuf desséché, celui-ci s'éparpille en une substance d'aspect farineux. Si l'œuf est hydraté, l'embryon éclate immédiatement.

La fixation et la décortication sont donc indispensables. En outre, l'observation de l'œuf fixé et décortiqué n'est pas suffisante pour déterminer un stade, l'embryon, à n'importe quel stade, ayant, dans ces conditions, un aspect uniformément granuleux et opaque.

Cas de l'œuf. — La coque épaisse, dure et imperméable était un obstacle à la fixation et à la coupe : le microtome déchire la coque et en conséquence, les embryons.

La fixation. — Il fallait un fixateur à la fois pénétrant et durcissant : le Dubosq-Brazil à l'alcool-acide acétique s'est montré le plus efficace, le Bouin-Hollande ne durcissant pas suffisamment les tissus, ainsi que l'acide trichloracétique.

Les œufs préalablement gonflés dans de l'eau distillée, sont placés dans le Dubosq-Brazil pendant 48 heures. Au bout de ce temps, les œufs sont lavés à l'alcool à 90° pour éliminer l'excès de fixateur.

Décortication. — Les œufs durcis par le fixateur peuvent alors être décortiqués.

Malgré leur très faible dimension (200 μ de diamètre environ), les œufs sont décortiqués à la pince brucelle, au besoin en s'aidant de minuties, en opérant sous huile de paraffine qui augmente la visibilité. Cette

opération est délicate car il ne faut pas abîmer l'embryon ; pour cela, on peut utiliser la particularité suivante : l'embryon possède une face concave et une face convexe, la première s'emboîtant dans la seconde. Par contre, si on a eu soin de faire gonfler les œufs dans de l'eau distillée, la coque est parfaitement sphérique ; aussi, une partie de celle-ci est-elle vide : à l'aide des pinces, en tapotant doucement la surface de l'œuf, on repère cette partie vide. On peut alors pincer la coque à cet endroit avec des brucelles très fines sans risquer de léser l'embryon sous-jacent ; on la déchire avec une deuxième paire de brucelles ; la coque s'ouvre et l'embryon durci par le fixateur est facilement dégagé. Il est bon d'ailleurs de conserver quelques fragments de coques et quelques œufs non décortiqués ; cela permet une étude simultanée de la coque.

Les œufs ainsi décortiqués et placés dans de l'alcool à 70°, représentent un très petit volume. Aussi, n'est-il pas possible de les inclure directement dans la paraffine, où ils seraient facilement égarés.

J'ai alors utilisé la double inclusion de Chatton (utilisée pour l'étude des protozoaires). Les œufs, après hydratation, sont inclus dans un minuscule bloc d'agar. Celui-ci, après déshydratation très lente et très ménagée, est inclus à son tour dans la paraffine.

Coloration. — Elle a été faite à l'hémalun-éosine.

Cas de la femelle. — Les femelles sont fixées par le Dubosq-Brazil, comme précédemment. Les poches ovigères sont séparées de l'animal et incluses par groupes de cinq a six dans un bloc de paraffine. La double inclusion est inutile.

Résultats.

La fécondation et les tout premiers stades du développement sont connus depuis longtemps : les travaux d'Artom (1) et de Gross (56), étudiant la première division de l'œuf fécondé et de l'œuf parthénogénétique, sont particulièrement importants et détaillés. Fransemeier (43), puis, plus récemment Weisz (107) étudient le nauplius après l'éclosion (segmentation du métanauplius). A ma connaissance, seule, Fautrez-Firlefyn (35), au cours d'une étude des acides nucléiques dans les jeunes stades d'*Artemia*, décrit tous les stades de la fécondation au nauplius. Sur mes coupes, il a été aisé de reconnaître la presque totalité de ces stades (à l'exception des tout premiers).

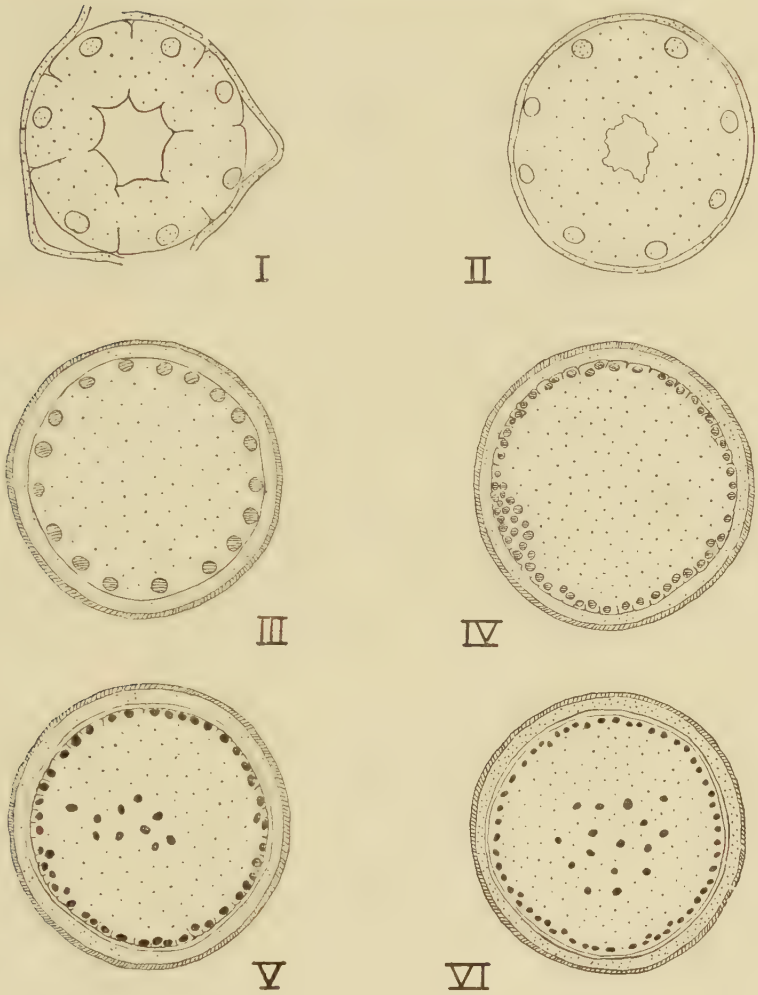


Fig. 1. — I, II, III : Évolution de la blastule. IV, V, VI : Gastrulation et jeune gastrule.

La blastule. — Déjà, au stade de morule à quatre blastomères, un petit blastocoele est visible (Fautrez-Firlefyn). A partir du stade 32, le blastocoele est très développé et constitue une large couronne de blastomères. Les noyaux, de volume élevé, sont très peu basophiles : les parties internes des cellules forment des cônes pénétrant dans le blastocoele (fig. 1 : I). Fautrez-Firlefyn note que, déjà, à ce stade, on observe une plage de noyaux très volumineux qui formeront, par la suite, la plaque syncipitale.

D'autre part, elle décrit, à ce moment, un phénomène particulier,

qu'il m'a été également facile de voir : les blastomères augmentent de volume et tendent à remplir la cavité de segmentation. Une lyse de la membrane cellulaire se produit ; les noyaux, toujours faiblement basophiles, migrent vers la surface : le blastocoele a, alors, complètement disparu. Les noyaux se multiplient en surface en devenant de plus en plus basophiles. A ce moment, les parois cellulaires se reforment : le germe prend alors l'apparence d'une périblastule. Les noyaux sont très nombreux et très basophiles. On note toujours une plage de très gros noyaux (fig. 1 : II, III, IV).

La gastrule. — La gastrulation est aisément observable. Dès l'apparition du blastopore, l'embryon acquiert une symétrie bilatérale (Fautrez-Firlefyn).

On assiste à une multiplication cellulaire intense. Certaines cellules invaginées, se rapprochant de la plaque syncipitale, forment l'endoblaste, d'autres se dispersent dans le vitellus et forment le mésoblaste.

L'embryon qui était jusqu'alors sphérique, s'incurve (suivant l'axe antéro-postérieur, d'après Fautrez-Firlefyn) (fig. 1 : IV, V, VI ; fig. 2 : VII, VIII).

Le nauplius. — Le tube digestif s'organise, ainsi que les ébauches des membres. L'embryon s'arrondit à nouveau et prend la forme de poire caractéristique du nauplius.

L'œil médian apparaît en même temps que les appendices acquièrent leur forme ; le nauplius est alors prêt pour la nage.

Chez la femelle vivipare où ces stades ont été observés, le rejet de l'embryon dans le milieu extérieur se fait lorsque ce dernier est un nauplius bien formé et déjà doué de mouvements de nage dans l'ovisac de la mère.

Dans le cas de l'oviparité, qu'observe-t-on ?

1° *Au moment de la ponte*, les embryons sont déjà au stade gastrule avancée (fig. 2 : VII, VIII). C'est le stade précédant immédiatement le stade d'organisation du nauplius. Ils restent évidemment à ce stade pendant toute la durée de leur diapause.

2° *Pendant l'anhydrobiose* (fig. 2 : IX, X), ils sont encore naturellement au stade précédent. On n'observe jamais, chez l'*Artemia* bisexuée de Californie, de jeunes blastules, comme l'a signalé Dawidoff, dans les *Artemia* des salines d'Odessa.

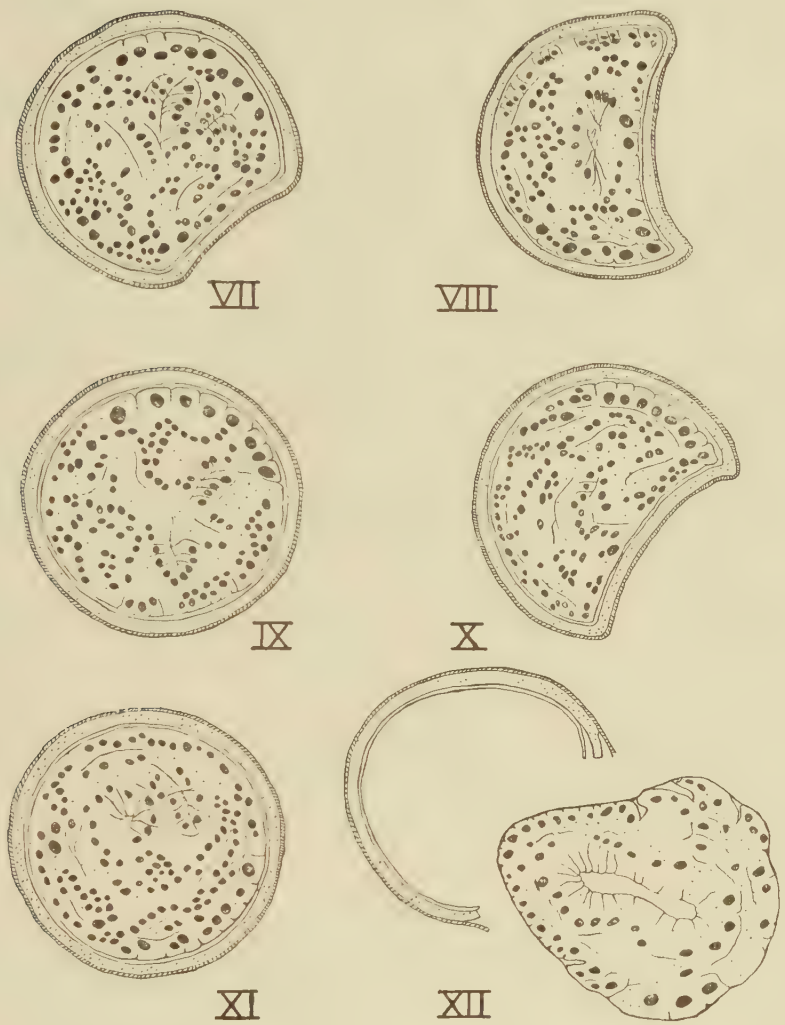


FIG. 2. — VII, VIII : Embryons à la ponte. IX, X : Embryons prélevés dans des œufs durables en anhydrobiose. XI : Les mêmes, mais après immersion, et quelques heures avant l'éclosion. XII : Éclosion du nauplius.

Dans les œufs du commerce, tous les embryons, sans exception, sont à ce stade. Il est vrai qu'il est assez difficile de distinguer ce stade « pré-nauplius » du stade d'organisation du nauplius. Mais, ce qui nous importe ici, est d'avoir des œufs homogènes et de stades très voisins ; il aurait été gênant d'avoir par exemple, simultanément, des stades jeune blastule, début de gastrulation, pré-nauplius et nauplius.

L'étude du métabolisme portera donc sur la période courte mais importante de l'organisation du nauplius et de son éclosion.

3° *Pendant l'immersion et à l'éclosion* on voit le tube digestif et les membres s'organiser plus nettement (fig. 2 : XI, XII).

La formation de l'œil médian signe la fin de la formation du nauplius. Pour l'observer, j'ai utilisé la fixation au formol qui, à l'encontre du Dubosq-Brazil, ne dissout pas les caroténoïdes qui le font facilement reconnaître. Dans l'œuf en anhydrobiose, l'œil médian n'est pas formé. Il n'est pas non plus visible dans un œuf immergé. Il apparaît au moment de la rupture de la coque ; il devient encore plus visible après l'éclosion.

La forme caractéristique du nauplius n'apparaît qu'au moment de l'éclosion hors de la coque.

La formation de la coque. — La coque commence à se former très tôt.

Dans la très jeune blastule, une enveloppe encore mince, mais cependant d'épaisseur très appréciable, est parfaitement visible.

Elle s'épaissit de plus en plus pour avoir son aspect final à la fin du stade blastule. A ce moment, on voit déjà la surface brune de la coque.

La mince enveloppe interne transparente ne commence à apparaître qu'au moment de la gastrulation.

Elle épaissit, peu à peu, pendant toute la durée de la gastrulation. Elle est très bien formée au moment de la ponte et reste très visible dans l'œuf durable (fig. 1 et fig. 2).

Conclusion.

La vie de l'œuf durable, depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion du nauplius, peut être divisée en plusieurs périodes :

1° *de la fécondation au début de l'apparition de la coque.* — Ce sont les premiers stades après la fécondation : les œufs ne sont encore entourés d'aucune membrane ni coque. Le développement se poursuit normalement jusqu'au stade blastule jeune présentant un large blastocoele.

2° *de la formation de la coque à la ponte.* — L'embryon poursuit son développement normal (gastrulation et stade prénauplius). Les glandes coquillières maternelles l'entourent d'abord d'une épaisse coque, puis il s'entoure lui-même d'une mince enveloppe transparente. Son développement s'arrête alors.

3° *Après la ponte ; la diapause.* — Les embryons au stade prénauplius, entourés de leurs deux coques, sont rejetés dans le milieu extérieur. Mais l'embryon ne poursuit toujours pas son développement. Il peut ainsi rester en diapause pendant plusieurs mois.

4° *L'anhydrobiose.* — En général, dans la nature, les œufs en diapause, flottant à la surface de l'eau sont rejetés sur les berges où ils subissent une dessiccation poussée. A l'état sec, ils peuvent ainsi survivre pendant de nombreuses années.

5° *Immersion et éclosion.* — La dessiccation a le pouvoir de rompre la diapause (v. p. 24). L'embryon desséché remis dans une eau de mer de salinité convenable, poursuit son développement et devient un nauplius qui fait éclater la coque et en sort pour nager activement. Dans le cas de la viviparité, on n'observe pas d'arrêt dans le développement : celui-ci se poursuit normalement et sans interruption décelable, depuis la fécondation jusqu'au nauplius (cinq à six jours environ).

Chapitre II.

OBSERVATIONS PHYSIOLOGIQUES

La diapause.

Mise en évidence. — Nous avons vu (Lochhead, Mathias) que la femelle ovipare peut pondre deux sortes d'œufs dont l'aspect extérieur est sensiblement le même dans les deux cas : les premiers éclosent très rapidement après la ponte, ce sont les œufs immédiats. Les autres restent longtemps en vie latente, c'est-à-dire en diapause. D'après Mathias, ils pourraient occasionnellement éclore spontanément, mais au bout d'un temps toujours long (plusieurs mois) ; en général, ils doivent subir une dessiccation pour pouvoir sortir de cette diapause. D'autre part, Needham (79), traitant de l'éclosion osmotique, cite le cas des œufs d'*Artemia* qui ne peuvent éclore que si le milieu où ils se trouvent, a une pression osmotique inférieure à celle du milieu intérieur de l'œuf : si la salinité de l'eau où sont pondus les œufs est trop élevée, les œufs

n'éclosent pas et restent ainsi jusqu'à ce qu'ils rencontrent une eau de salinité suffisamment basse.

J'ai personnellement fait les observations suivantes :

Premier cas. — Des femelles, dont les poches ovigères sont bourrées d'œufs, sont isolées dans un petit récipient contenant de l'eau de mer propre et dont la salinité est celle des élevages, c'est-à-dire faible (eau de mer additionnée de 15 $^{0}/_{00}$ de Cl Na).

Dès que les œufs sont pondus, ils sont recueillis à l'aide d'une pipette effilée : notons qu'ils n'ont pas tous la même densité, certains surnagent alors que d'autres tombent au fond du cristallisoir.

Les uns sont placés dans une petite quantité d'eau de mer. D'autres sont placés sur le fond d'une boîte de Pétri, recouvert d'un papier filtre largement imbibé d'eau ordinaire ou distillée ; la boîte fermée est placée sous une lampe qui la chauffe vers 25 à 30° : dans ces conditions, les œufs du commerce éclosent en moins de 24 heures. Ce procédé est utilisé, car il permet une observation précise et rigoureuse des éclosions, tout en évitant la concentration de l'eau de mer par évaporation. Les œufs ainsi fraîchement pondus ont une forme parfaitement sphérique et la conservent pendant l'immersion. *Ils n'éclosent pas.* J'ai gardé plusieurs lots pendant deux mois environ sans qu'aucun d'eux n'éclose.

Cette durée est suffisante pour justifier le terme de « diapause » (le développement entier normal se fait en six jours environ). Sans doute cette diapause peut se poursuivre pendant plus longtemps.

Deuxième cas. — Si les femelles vivent dans une eau de salinité très élevée (150 à 200 $^{0}/_{00}$ en Cl Na), les œufs pondus restent dans cette eau sans éclore : c'est le cas signalé par Needham. Ils prennent une forme aplatie semblable à celle des œufs desséchés du commerce ; en fait ils ont perdu l'eau qu'ils contenaient au moment de leur ponte. J'ai conservé ainsi, pendant de longs mois (8 à 10 mois), des œufs récoltés dans des salines de Sète.

Mais, ici, nous ne pouvons pas parler de diapause car ces œufs placés dans une salinité suffisamment basse, éclosent très rapidement. Nous allons voir, en effet, que la diapause existant à l'origine a été rompue par cette « déshydratation en milieu liquide ».

Rupture. — 1° *Rôle de la dessiccation à l'air libre.* — Il est généralement admis que, dans la nature, c'est la dessiccation qui rompt la dia-

pause des œufs durables. Ceux-ci, après avoir été pondus, surnagent et sont poussés par le vent ou les courants sur les berges où ils subissent une dessiccation ; il suffit que le hasard les fasse revenir au contact de l'eau pour qu'ils éclosent.

En effet, expérimentalement, la dessiccation permet de rompre la diapause.

Après s'être assuré qu'ils sont bien en diapause, des œufs récoltés au sortir de la mère vivant dans une salinité basse, sont divisés en plusieurs lots.

a) le premier lot est abandonné à l'air libre ;

b) le second lot est desséché à l'étuve sous vide à 25° ;

c) le troisième lot est placé dans un dessiccateur à $P_2 O_5$ à la température du laboratoire.

Ces œufs, après un séjour plus ou moins long dans ces conditions, sont placés dans une eau et à une température permettant l'éclosion. Ils éclosent normalement. Il est à noter que la dessiccation doit être suffisante. Les œufs ont dû rester à l'air libre au moins huit jours pour éclore. Dans les deux autres cas, il leur a fallu moins de temps (mais au moins environ 48 heures).

Ces résultats sont à rapprocher d'une observation très intéressante de Barigozzi (3) : il a remarqué que, quand on fait éclore des œufs, il y a en général un certain pourcentage qui n'éclôt pas. On pourrait croire que ces œufs sont morts. Il n'en est rien ; il suffit, après les avoir recueillis, de les dessécher énergiquement. Remis dans l'eau, ils éclosent normalement.

Barigozzi reconnaît ne pouvoir expliquer « pourquoi les œufs riches en eau ne peuvent éclore ».

2°. *Déshydratation osmotique.* — Cependant, pour Mathias, la dessiccation, si elle interrompt nécessairement la diapause, n'est pas indispensable et peut être remplacée par d'autres facteurs. Il cite alors l'immersion dans les solutions concentrées de Cl Na et de glucose, sans en tirer d'ailleurs aucune conclusion.

Effectivement, j'ai pu facilement constater qu'une immersion prolongée (15 jours à un mois) dans une solution saturée de Cl Na interrompt la diapause. Pendant leur immersion dans la solution saline, les œufs avaient pris la forme caractéristique des œufs desséchés.

En fait, l'immersion prolongée dans des solutions concentrées n'a

d'autre conséquence qu'une déshydratation intense jouant le même rôle que la dessiccation à l'air libre. Dans la nature, c'est le cas des œufs pondus dans une eau de salinité très élevée qui, non seulement ne permet pas leur éclosion, mais encore provoque la rupture de leur diapause.

On peut alors parler paradoxalement de « déshydratation au milieu aqueux » ou, mieux, de « *déshydratation osmotique* », par opposition à la « *déshydratation à l'air libre* ».

Nous pouvons dire que, dans ces deux cas, les embryons ne sont déjà plus en « diapause », mais en « *anhydrobiose* », le terme de « vie latente » pouvant englober la diapause et l'anhydrobiose.

Conclusion. — La rupture de la diapause est sous la dépendance d'une déshydratation intense (mais pas nécessairement complète, sinon la déshydratation osmotique ne serait pas suffisante) des tissus embryonnaires. Dans la nature, elle s'accomplit de deux façons :

1° Les œufs pondus sont poussés sur les berges par le vent ou abandonnés par l'eau qui disparaît par évaporation. C'est le cas de la déshydratation à l'air libre. Ce phénomène ne joue peut-être pas un grand rôle dans le cas d'*Artemia salina*.

2° Généralement, les œufs durables d'*Artemia* sont pondus dans une eau de salinité très élevée (200 °/₀₀ en Cl Na et plus) qui, non seulement ne permet pas leur éclosion, mais encore provoque une déshydratation suffisamment intense pour rompre leur diapause. Les œufs restent dans l'eau sans éclore. Ils ne sont cependant pas en diapause, mais en anhydrobiose, exactement dans les mêmes conditions physiologiques que les œufs abandonnés sur les berges. Il suffit qu'une pluie abondante survienne pour qu'ils puissent éclore sans avoir quitté le milieu aquatique. Il arrive sans doute généralement que ces œufs soient déposés sur les berges où ils subissent une dessiccation à l'air libre ; mais celle-ci ne joue plus alors aucun rôle actif.

L'anhydrobiose.

Les œufs durables supportent très bien la déshydratation qui leur permet de sortir de leur diapause.

La possibilité d'une déshydratation intense compatible avec la survie, a intéressé pendant longtemps la curiosité des biologistes, d'autant

plus que cette déshydratation permet aux organismes qui la tolèrent de supporter en outre des conditions extraordinaires de température et de pression qui entraînent normalement la mort.

De multiples travaux ont été faits à ce sujet sur de nombreux organismes végétaux ou animaux (travaux de Becquerel (5)).

Les observations sur les œufs durables d'*Artemia* sont abondantes (Mathias, Whitaker (108)). Signalons toutefois, que ces propriétés de longévité, de résistance aux températures extrêmes et au vide, ne sont en réalité que la conséquence d'une déshydratation parfaite.

C'est précisément la réalisation de cette déshydratation des protéines de l'embryon et la nature de ces protéines qui seraient intéressantes à étudier.

Résistance aux températures extrêmes.

Pour Whitaker, les embryons enkystés d'*Artemia* supportent — 190° pendant 24 heures.

Pour Mathias, ils supportent + 81° pendant une heure.

Personnellement, j'ai constaté que des œufs supportent pendant 24 heures, une température voisine de + 66° ; mais, vers cette température, se situe le point critique au-delà duquel les embryons ne peuvent survivre. En poussant plus loin et plus rigoureusement la déshydratation, on doit pouvoir atteindre des températures plus élevées.

L'œuf supporte une température de — 65° pendant 8 jours. Mais, laissé 25 jours à cette basse température, un lot n'a donné qu'un très faible pourcentage de nauplius. Ici aussi, une déshydratation rigoureuse devrait permettre une plus grande résistance.

Résistance au vide.

Pour Whitaker, ils supportent pendant six mois un vide presque absolu.

Longévité.

Des germes desséchés ont donné des nauplius après 15 ans.

Variation de la teneur en eau.

Les œufs que j'avais en ma possession contenaient en moyenne 8,5 % d'eau. La majeure partie de cette eau peut être enlevée facilement à basse température (20°), en plaçant l'œuf en atmosphère sèche

(par exemple en présence de P_2O_5 ou de SO_4H_2) tout aussi bien qu'à l'étuve à 105°. Ce n'est donc pas de « l'eau de constitution » liée aux protéines, mais une « eau d'imbibition » facilement mobilisable en agissant simplement sur le degré hygrométrique du milieu ambiant. Il semble cependant que 1 % soit de l'eau liée.

Les œufs sont très hygroscopiques ; en atmosphère saturée, ils fixent en deux jours 70 % de leur poids d'eau à partir de la vapeur d'eau ambiante, soit à peu près l'eau qu'ils absorbent quand on les place dans un milieu aqueux.

La teneur habituelle des œufs (8,5 %) doit correspondre à la teneur habituelle en vapeur d'eau de l'atmosphère du laboratoire.

Fixation et élimination d'eau sont parfaitement réversibles sans répercussion néfaste sur la survie de l'embryon ; tant qu'il n'est pas sorti de sa coque, l'embryon peut subir sans en souffrir de nombreuses alternatives de dessiccation et d'immersion. Par contre, dès l'éclosion, une dessiccation lui est fatale. On peut se demander quel est le rôle de la coque. Je n'ai pas approfondi cette question, mais on peut penser qu'elle intervient en freinant et en régularisant l'évaporation ; en outre, il se pourrait qu'au moment de l'éclosion, la structure des protéines se modifie : l'analyse biochimique montre qu'avant l'éclosion, le taux d'N non protéique est très faible, ainsi que l'activité enzymatique ; par contre, dès l'éclosion, le métabolisme protidique devient intense, avec élévation considérable du taux d'N non protidique (v. p. 79) et mise en activité des protéinases et des peptidases (Bellini (6)).

L'éclosion.

De nombreux auteurs ont déjà étudié l'éclosion dans son aspect descriptif : Lochhead (71), Barigozzi (3), Boone et Baas Becking (9), Tha Myint (95).

Description.

Je n'en exposerai pas ici tous les détails fort bien décrits par ailleurs par Tha Myint. Je n'en donnerai que l'essentiel.

L'éclosion se fait en deux temps :

1°. *Sortie de la coque brune.* — Une fente apparaît dans l'œuf ; l'embryon, montrant son œil médian, se dégage de plus en plus de la coque ; mais, d'aspect piriforme, il est encore étroitement entouré d'une

enveloppe excessivement fine et transparente ; ses appendices, visibles par transparence, sont animés de temps en temps par de très faibles mouvements.

A ce stade, l'ensemble coque-embryon présente un aspect très caractéristique : la coque vide et légère est dirigée vers la surface de l'eau ; au-dessous d'elle et attaché par son extrémité postérieure, se trouve l'embryon inerte et piriforme, de couleur orangée. Il reste ainsi immobile pendant 6 à 8 heures.

2°. *Sortie de l'enveloppe transparente.* — Les mouvements du nauplius deviennent suffisamment puissants pour déchirer la membrane. Le nauplius, libéré, nage activement. L'éclosion est terminée.

Comme l'a montré Tha Myint, cette enveloppe est constituée par deux très fines membranes. Ces deux menbranes (Lochhead, Tha Myint) entourent le nauplius dans l'ovisac de la mère vivipare, mais il s'en est déjà libéré lorsqu'il est rejeté dans le milieu extérieur.

Conditions externes.

Besoin en eau. — Il est évident que l'eau est nécessaire à l'éclosion ; mais certains ions ne sont-ils pas également indispensables ? Il est facile de s'en assurer.

Immergés dans de l'eau distillée, les œufs durables éclosent toujours très normalement en donnant des nauplius nageant activement.

Donc, si l'eau est indispensable à l'éclosion normale, les ions minéraux ne le sont pas.

Besoin en oxygène. — Pour évaluer le besoin en oxygène, j'ai immergé des œufs dans de l'eau distillée bouillie, puis j'ai recouvert le tout avec une couche d'huile de paraffine. Dans ces conditions, les œufs n'éclosent pas. Des œufs témoins placés dans de l'eau distillée non bouillie et recouverts d'huile de paraffine éclosent parfaitement bien. Les résultats sont analogues dans des solutions de Cl Na, de Cl K, Cl_2 Mg, Cl_2 Ca isotoniques à une solution M de Cl Na.

Ainsi, l'oxygène est indispensable à l'éclosion. Ce besoin absolu en oxygène explique sans doute les deux observations suivantes :

1° Les œufs légers qui flottent en surface éclosent beaucoup plus vite que les œufs lourds qui restent au fond de l'aquarium ; en surface, l'approvisionnement en O_2 est beaucoup plus abondant, même si les

œufs sont très nombreux ; les différences d'épaisseur des coques jouent également dans le même sens.

2° Des œufs lourds, préalablement imbibés d'eau distillée, placés dans de l'eau de mer, tombent au fond du cristallisoir et n'éclosent pas, ou seulement avec beaucoup de retard (J. Dutrieu (27)). Sans doute ces œufs, réunis en masse au fond du récipient, manquent-ils d'oxygène.

Conditions de température. — Une température suffisamment élevée est indispensable ; l'optimun est situé vers 30°, mais on observe encore l'éclosion vers 20-22°, bien que le phénomène soit ralenti. Placés au frigidaire, les œufs gonflent mais n'éclosent pas. Que la température influe sur la vitesse de développement est un phénomène banal qui, jusqu'à maintenant, ne présente ici d'autre intérêt que l'application pratique.

Nous pouvons déjà avancer que pour une température convenable, *l'eau et l'oxygène sont nécessaires mais suffisants pour assurer une éclosion normale.* Par contre, les sels minéraux ne sont pas nécessaires. Ils peuvent même empêcher l'éclosion complète, soit par un excès de pression osmotique, soit par une action toxique de certains ions.

1°. *Inhibition de l'éclosion en milieu hypertonique.* — Jennings et Whitaker (61) ont déjà étudié les limites de concentrations salines permettant l'éclosion.

J'ai repris moi-même ces observations.

J'ai trouvé que la limite d'éclosion s'observe pour des solutions pures de :

Cl Na	80 °/oo
Cl K	100 »
$Cl_2 Mg, 6H_2O$	170 »
$Cl_2 Ca, OH_2O$	100 »

Or, il est très remarquable que ces solutions sont à très peu près *isotoniques* ; en effet, il faut considérer qu'une molécule de $Cl_2 Mg$ ou de $Cl_2 Ca$ donne en solution 3 ions alors qu'une molécule de Cl Na ou de Cl K n'en donne que 2 (ce n'est qu'une approximation grossière, les phénomènes de dissociation étant infiniment plus complexes.)

L'éclosion dans des solutions salines ne se produit donc qu'au-dessous de certaines limites de concentration. Au delà de ces limites, l'embryon, par le jeu des phénomènes osmotiques, ne dispose plus du

minimun d'eau nécessaire à un développement normal et ne peut donc atteindre le stade correspondant à l'éclosion.

2°. *Inhibition par action toxique spécifique de certains ions.* — Cette question a déjà été abordée par Boone et Baas Becking (9). Ils ont étudié avec soin l'éclosion hors de la coque et hors de la membrane, dans des solutions pures et des mélanges en proportions variables de Cl Na, Cl K, Cl_2 Mg, Cl_2 Ca. Ayant observé qu'aucune éclosion hors de la coque ne se faisait dans les solutions de Cl_2 Mg, qu'une faible éclosion avait lieu dans le Cl_2 Ca, que Cl K permettait l'éclosion hors de la coque, mais non hors de la membrane, que Cl Na permettait l'éclosion normale, ils en ont conclu que certains ions (Mg^+, Ca^+, K^+) étaient toxiques (à différents degrés et de façons diverses sur l'éclosion hors de la coque et hors de la membrane) et étaient compensés par le Na à des degrés différents.

Mais ils utilisaient des solutions M de ces sels, c'est-à-dire renfermant une molécule/gramme par litre. Or, une solution M de Cl_2 Mg, $6H_2O$ (à 203 °/oo) ne peut permettre l'éclosion, non pour des raisons de toxicité, mais pour des raisons osmotiques puisque nous venons de voir que l'éclosion n'a plus lieu à partir de 170°/oo de Cl_2 Mg, $6H_2O$. De même une solution M de Cl_2 Ca, OH_2O (à 110 °/oo) se trouve à la limite des possibilités d'éclosion (100 °/oo). Par contre, les solutions M de Cl Na (58 °/oo) et de Cl K (74 °/oo) permettent la pénétration osmotique de l'eau, la pression osmotique interne de l'embryon n'étant compensée que par une concentration ionique externe de 80 °/oo de Cl Na et de 100 °/oo de Cl K.

Il est *très important* de distinguer soigneusement les deux étapes successives de l'éclosion : sortie de la coque brune, puis rupture de la membrane interne.

En effet, il ressort de mes observations qu'au-dessous de la concentration ionique critique, la première étape se réalise toujours : dès que la concentration du milieu est suffisamment faible pour ne pas provoquer la déshydratation des tissus embryonnaires, la coque brune se rompt après un certain temps d'immersion, sans qu'on puisse attribuer à aucun ion une action toxique spécifique sur le développement et sur la sortie de l'embryon hors de la coque. Mais il n'en est pas de même si l'on considère la deuxième étape (rupture de la membrane interne) et la survie de l'embryon libéré.

Cas du Cl Na :

Quelle que soit la concentration en Cl Na (de 0 à 80 °/₀₀), toujours, l'éclosion se poursuit normalement, d'abord hors de la coque, puis hors de la membrane, en donnant un nauplius parfaitement normal.

Cas du Cl K :

Pour une échelle de concentrations allant de 0 à 100 °/₀₀, on observe toujours la rupture de la coque et la sortie de l'embryon enveloppé. Le temps d'incubation précédant ce phénomène est même toujours plus court qu'avec les autres ions. On sait que l'ion K^+ a la propriété bien connue d'augmenter la perméabilité des membranes.

Par contre, on n'observe pas la rupture de la membrane interne, et l'embryon meurt enveloppé dans celle-ci.

L'ion K^+, même à concentrations moyennes, exerce une action toxique qui inhibe la deuxième étape de l'éclosion et ne permet pas la survie du nauplius.

C'est seulement pour des concentrations extrêmement faibles que l'éclosion parvient à son terme et que l'on observe une survie très limitée.

Cas du $Cl_2 Mg$ et du $Cl_2 Ca$:

Les concentrations très faibles permettent une éclosion complète. Mais le nauplius libéré meurt rapidement, sans doute par suite du déséquilibre ionique.

Pour des concentrations plus élevées, la coque s'ouvre et l'embryon apparaît, mais il semble immédiatement foudroyé sur place par l'action toxique de l'ion Ca^+ ou Mg^+.

Conclusion.

On peut résumer l'action des ions Na, K, Ca, Mg, de la façon suivante :

1° Avant l'éclatement de la coque, les ions en solution n'ont d'action que par la pression osmotique qu'ils confèrent au liquide qui les contient. Ils n'ont aucune action directe sur l'embryon car la coque épaisse qui entoure ces derniers leur est imperméable. La coque ne laisse passer que l'H_2O et l'O_2.

2° Le Na^+ n'est pas toxique et permet la survie.

3° Le K^+ est extrêmement toxique pour le nauplius. Ceci est très en accord avec les travaux de Boone et Baas Becking sur le nauplius

et de Martin et Wilbur sur l'adulte (74). Mais la coque épaisse lui est imperméable et sans doute également, la fine membrane qui entoure le nauplius. En effet, malgré la très grande toxicité du K, le nauplius se libère très normalement de la coque, même à des concentrations élevées en K. Ce n'est qu'au moment de sortir de la membrane qu'il en subit l'action toxique et meurt immédiatement.

4° Le Mg^{++} et le Ca^{++} : ils sont beaucoup moins toxiques que le K^{+}. La coque leur est imperméable, mais, par contre, la fine membrane leur est sans doute perméable, leur action toxique se révélant dès la sortie de l'embryon hors de la coque.

Nous verrons que les dosages de Cl, de Na, de K, et des réserves vitellines en cours d'immersion et au moment de l'éclosion, confirment la majeure partie de ces conclusions.

Survie des embryons en dehors de l'organisme maternel. — Dans le cas de la viviparité, l'embryon étant dépourvu de coque, on peut reconnaître approximativement son stade à la loupe binoculaire. Bien que transparente, la poche ovigère de la mère gêne l'observation ; il est préférable de la déchirer afin d'en extraire les embryons. Ceux-ci peuvent-ils survivre dans le milieu extérieur ?

J'ai examiné de nombreux lots à différents stades (blastules, jeunes gastrules, organisation du nauplius, nauplius bien formé), immergés dans l'eau de mer additionnée de 15 °/₀₀ de Cl Na et chauffés vers 25°.

Je n'ai pu observer de survie, dans ces conditions, qu'à partir du stade précédant l'organisation du nauplius. Partant d'un embryon encore opaque et très finement granuleux, on voit rapidement son aspect s'éclaircir, les membres se former, la forme s'allonger, l'œil médian apparaître et l'animal, enfin, nager activement. S'il renferme des carotiprotides, ceux-ci sont scindés et le nauplius se colore en orangé plus ou moins intense.

Chez les embryons portés normalement par la mère, ce même phénomène s'observe au même moment (cf. p. 102). Rappelons enfin que l'œuf durable est pondu à ce stade.

Il semble donc que l'animal franchit, à la fin du stade gastrule un *point critique* important caractérisé : 1° par l'acquisition d'une certaine indépendance vis-à-vis de la composition ionique du milieu dans lequel il vit, 2° par un remaniement de la structure de ses réserves manifesté par la scission des carotiprotides, 3° par la possibilité de l'apparition d'une diapause.

Il serait intéressant de rechercher s'il existe un liquide de composition saline telle qu'elle permette la survie de l'embryon à des stades plus précoces. Les résultats obtenus permettraient peut-être de connaître les ions et les phénomènes osmotiques auxquels est sensible l'embryon dépourvu de coque ; de tels résultats devraient être comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions sur des embryons entourés d'une coque.

Chapitre III.

OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES

Les œufs durables se trouvant à volonté dans le commerce, constituent un matériel de choix pour l'étude biochimique de l'embryon qu'ils contiennent. Nous avons vu, dans un des chapitres précédents, qu'ils se trouvent tous au même stade de développement. En déterminant d'une part la composition de l'embryon dans l'œuf durable et d'autre part, la composition du nauplius à l'éclosion, nous pourrons déterminer les fractions des réserves vitellines utilisées au moment de la rupture de la diapause et de la reprise du développement.

De plus, il a paru indispensable de déterminer l'évolution de la composition de l'embryon pendant l'immersion, avant l'éclosion. En effet, il était à priori possible que l'embryon se trouvant subitement, lors de l'éclosion, immergé dans un milieu bien différent du précédent, sa composition se trouve modifiée en conséquence à ce moment là seulement.

Il aurait été intéressant de pouvoir déterminer la composition de l'œuf à la ponte, au début de la diapause. En effet, si la composition ne change certainement pas pendant la période d'anhydrobiose, la vie étant alors véritablement suspendue, il est possible que, pendant la diapause, c'est-à-dire de la ponte à la dessiccation (période dont la durée est très variable), il se fasse un certain remaniement dans la nature des réserves. Trois cas peuvent se présenter :

1° Il n'y a aucune modification : le métabolisme est entièrement arrêté, la vie suspendue, comme en anhydrobiose ;

2° Il y a une modification légère dans le même sens que celle présentée au cours de la reprise du développement normal : cette diapause serait véritablement une « vie ralentie » ;

3° Il y a une modification totalement différente, spécifique de la diapause (telle que accumulation de glucides ou de lipides).

Malheureusement, jusqu'à présent, je n'ai jamais pu rassembler suffisamment d'œufs durables au sortir de l'ovisac maternel. Il y aurait à éclaircir ce point.

Aussi, dans ce chapitre, sera déterminée la composition en chacune des principales réserves, des embryons en anhydrobiose, des embryons en développement et des nauplius venant d'éclore. Il en sera déduit le mode d'utilisation des réserves vitellines pendant cette période embryonnaire.

Techniques générales.

Lipides, acides gras et insaponifiable.

Lipides totaux. — Le matériel, finement pulvérisé et imbibé d'alcool, est placé dans la nacelle de papier d'un appareil de Kumagawa ; il est extrait par l'alcool bouillant jusqu'à décoloration du liquide d'extraction et encore une heure après (au total, 4 heures environ, pour des quantités de l'ordre du gramme).

On obtient ainsi un résidu de substances insolubles dans l'alcool bouillant et un extractif alcoolique qui contient outre les substances lipidiques, des substances de faible poids moléculaire. Après évaporation, l'extrait alcoolique est pesé : la somme (poids du résidu + poids de l'extractif) donne le poids sec total. Dans le cas des œufs qui sont un matériel déjà desséché, le liquide d'extraction est essentiellement alcoolique.

L'extrait alcoolique après évaporation et pesée, est traité à plusieurs reprises par le benzène à froid qui dissout les lipides. Après évaporation, la pesée de l'extrait benzénique sec fournit la quantité totale de lipides.

Acides gras et insaponifiable. — Un poids connu des lipides précédents est saponifié pendant quatre heures par de la potasse alcoolique au réfrigérant à reflux. Après refroidissement et addition d'un peu d'eau à la liqueur de saponification, on agite celle-ci à plusieurs reprises

dans une ampoule à décantation avec de petites quantités d'éther de pétrole fréquemment renouvelées ; on extrait ainsi tout l'insaponifiable (stéroïdes, caroténoïdes, etc...). On réunit les fractions éthérées et on les lave à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'eau de lavage. L'extrait éthéré est alors évaporé à sec. Le poids de l'extrait sec est celui de l'insaponifiable.

La solution hydro-alcoolo-potassique qui contient les acides gras sous forme de savon, est acidifiée ; les acides gras libérés sont extraits à leur tour par l'éther de pétrole ; les liqueurs réunies sont lavées à l'eau distillée puis évaporées ; le résidu sec est pesé et correspond aux acides gras.

L'azote. — L'N est dosé par la méthode de KJELDAHL après transformation de l'N organique en NH_3 par destruction sulfurique de la matière organique. L'entraînement par la vapeur d'eau se fait dans un appareil de PARNAS-WAGNER.

L'N total est dosé sur le matériel total préalablement desséché et pesé (œufs, nauplius, adultes) ; l'N protéique est dosé sur le résidu d'extraction des lipides et l'N non protéique est calculé par différence.

Les glucides. — Les glucides totaux par la méthode de G. Bertrand :

Le matériel très finement divisé est hydrolysé pendant 3 heures au B. M. 100°, sous réfrigérant à reflux, par HCl 2N. Le liquide d'hydrolyse après neutralisation par la soude, est déféqué au sous-acétate de Pb. Après filtration quantitative, l'excès de sous-acétate est éliminé par $SO_4 Na_2$.

Après une nouvelle filtration quantitative, le liquide est évaporé jusqu'à un volume de 20 cm^3. On dose alors les glucides par la méthode de G. BERTRAND.

Glucides totaux par semi-microméthode : La méthode précédente ne peut s'appliquer que dans le cas où l'on dispose d'un matériel renfermant au moins 10 mg de glucose ; ce n'était pas le cas dans la plupart des échantillons que j'avais à ma disposition. J'ai alors utilisé la méthode colorimétrique de FOLIN-WU. Comme précédemment, le matériel est hydrolysé par HCl 2N (ou mieux $SO_4 H_2$, non volatil) pendant trois heures. Après neutralisation, le liquide d'hydrolyse est étendu en vue du dosage colorimétrique ; étant donné la dilution effectuée, la défécation n'est pas nécessaire. Après filtration et prélèvement quantitatif, les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de WU (réduc-

tion d'un réactif cupro-sodique par les sucres recherchés ; formation d'un sous-oxyde de cuivre qui réduit à son tour le réactif phospho-molybdo-tungstique en donnant une coloration bleue, dont on apprécie l'intensité au photocolorimètre).

Glycogène. — Après dissolution du matériel dans la potasse concentrée qui dissout le glycogène sans le détruire, celui-ci est précipité par l'alcool. Recueilli par centrifugation, il est hydrolysé en glucose. Celui-ci est dosé par la méthode de Folin-Wu, ci-dessus, ou encore par la méthode de G. Bertrand si la quantité de glycogène est suffisante. J'ai appliqué aux œufs d'*Artemia* la méthode de Good, Kramer et Somogyi (voir Loiseleur (72)).

Le phosphore total. — Ici encore, deux techniques ont été utilisées soit en vue de vérifier la concordance des résultats, soit en fonction de la quantité de matériel disponible.

Méthode molybdomanganimétrique de Thivolle (96). — Elle se fait après destruction cupro-nitrique de la matière organique. Très précise elle a l'inconvénient d'être longue et d'exiger 0,5 mg de P dans la prise d'essai.

Méthode colorimétrique de Machebœuf-Delsal (v. Loiseleur). — Elle permet de déceler des quantités de phosphore de l'ordre du gamma. La difficulté de cette technique réside dans la destruction nitro-sulfurique.

Le calcium. — Le Ca est dosé par manganimétrie après précipitation sous forme d'oxalate, soit directement à partir du résidu de calcination, soit à partir du résidu de calcination du liquide de destruction de la matière organique.

Le sodium et le potassium. — Ils sont dosés par photométrie de flamme (Burriel-Marti, Ramirez-Munoz (18)) sur les liquides de destruction sulfoperchlorique ou nitro-perchlorique. Ceux-ci, après évaporation à sec, sont repris par l'eau distillée puis neutralisés par NH_3 et amenés à un volume connu sur lequel est fait le dosage.

Le fer. — Il est dosé sur le liquide de destruction sulfoperchlorique par la méthode colorimétrique au sulfocyanate (v. Loiseleur). Les intensités de la coloration rouge obtenue sont lues, dans l'alcool amylique, au photocolorimètre.

Les chlorures. — La destruction de la matière organique est faite en milieu liquide en présence de NO_3 Ag, par le mélange nitro-permanganique (méthode de LAUDAT). Sur le liquide de destruction, les chlorures sont dosés par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD.

La chitine. — La substance pulvérisée est traitée par la potasse à 10 % pendant cinq heures au B. M. bouillant. Seule la chitine n'est pas dissoute dans ces conditions. Recueillie par filtration, elle est lavée à plusieurs reprises par de l'acide chlorhydrique dilué, puis à l'eau distillée. Après dessiccation, elle est pesée.

Pour la spectroscopie dans le visible et le proche U. V., pour la microélectrophorèse sur papier des protéines, la chromatographie sur papier des glucides et des amino-acides, la chromatographie sur colonne, les détails des techniques seront donnés en même temps que les résultats.

A. — L'œuf en anhydrobiose.

1° IMPORTANCE RELATIVE DE L'EMBRYON ET DE LA COQUE.

Les œufs durables étant pourvus d'une coque très épaisse, il était impossible de faire uniquement l'analyse de l'œuf total et de l'attribuer à l'embryon.

Pour les raisons indiquées au sujet de l'étude histologique, on ne pouvait songer à les séparer mécaniquement.

De toute façon, il aurait été beaucoup trop long d'amasser des quantités d'embryons compatibles avec les méthodes d'analyse.

La difficulté a été tournée différemment : on analyse d'une part l'œuf total et, d'autre part, la coque vide. On en déduit facilement la composition de l'embryon à condition de connaître leurs proportions relatives.

Je devais donc déterminer avant tout :

1° le poids de l'œuf total,

2° le poids de la coque.

Lavage et tri des œufs. — Si les œufs proviennent directement des marais salants, ils sont extrêmement sales, mélangés à du sable, de la terre, des débris divers et du sel.

Après les avoir passés à travers un tamis très fin, qui élimine déjà beaucoup de débris, on les soumet à une première décantation en

ampoule, dans une solution de Cl Na à 25 % dont la densité est très élevée. Seul, le sable tombe ; les œufs pleins et les coques vides surnagent. On les soumet alors à une deuxième décantation dans l'eau : les œufs pleins tombent et les coques surnagent. On décante les œufs pleins. On lave à plusieurs reprises, 4 à 6 fois, avec de l'eau distillée, les œufs et les coques en poursuivant, si besoin est, leur séparation par décantation. On élimine ainsi le sel marin et de nombreuses impuretés très fines qui restent en suspension dans les eaux de lavage. Pour cette raison, il ne faut pas séparer les eaux de lavage par filtration, mais toujours par décantation.

Si on possède des œufs du commerce qui sont déjà à peu près propres, on peut se contenter de décantations et de lavages successifs dans de l'eau distillée.

Cependant, ils contiennent généralement de petites quantités de sable qui tombe immédiatement dès qu'on les place dans l'eau distillée. On l'élimine alors par une décantation immédiate. Il est à noter qu'il faut agiter vigoureusement les œufs dans l'eau distillée : en effet, les œufs pleins, de par leur forme, retiennent de l'air sur leur face concave et restent alors en surface ; une agitation et un début d'imbibition chassent cet air et permettent aux œufs pleins de tomber au fond de l'ampoule.

Les œufs pleins et les coques sont recueillis sur un papier filtre et desséchés à l'étuve sous vide à 40° en atmosphère maintenue anhydre par P_2O_5 pendant 48 heures au moins. Ils sont conservés ensuite dans un flacon hermétiquement bouché à l'abri de l'humidité, ou, mieux encore, dans un exsiccateur à P_2O_5.

Numérations. — Afin d'établir le poids relatif des embryons et des coques, j'ai procédé à une série de numérations sur des poids déterminés.

Ces œufs sont très petits, leur diamètre est d'environ de 200 à 250 μ ; on observe des variations de diamètre assez considérables, suivant les pontes et la grosseur des femelles. A ce propos, il faut faire ici une remarque valable pour tout travail fait sur ces œufs : tous les œufs n'ont pas la même dimension ni le même poids ; mais leur étude exigeant, vu leur petite taille, l'emploi de milliers d'entre eux pour un dosage, les résultats ont en eux-mêmes une valeur moyenne statistique.

Cependant, j'ai eu des lots d'œufs, pourtant de même provenance, qui différaient sensiblement entre eux. Ainsi, le premier lot que j'ai

eu en ma possession comprenait des œufs plus sombres, plus gros, plus denses, que ceux que j'ai eus par la suite. Leur différence de composition sera d'ailleurs indiquée au cours de ce travail : ils seront appelés « œufs lourds », en opposition aux « œufs légers » des derniers lots.

Techniques. — Etant donné leurs très faibles dimensions et leur extrême mobilité qui les fait glisser très facilement sur une feuille de papier, le choix de la technique était malaisé. Après quelques essais infructueux, la méthode suivante a été utilisée :

Une lamelle couvre-objet est tarée, après avoir été recouverte d'une fine couche de silicone. Elle est saupoudrée, aussi uniformément que possible, d'une quantité d'œufs voisine de deux à trois mg. Elle est pesée à nouveau. Le poids des œufs en expérience est ainsi connu exactement. La lamelle recouverte d'œufs est ensuite collée sur une feuille de papier blanc quadrillé. A la loupe binoculaire, on procède à la numération en s'aidant du quadrillage du papier.

La méthode est la même pour les œufs et pour les coques.

Résultats.

Œufs lourds. — Huit séries de numérations sur des œufs pleins desséchés, donnent un poids moyen de l'œuf de 3,98 γ soit 4 γ.

Sept numérations de coques vides donnent un poids moyen de la coque égal à : 1,3 γ.

Donc, la coque constitue en poids les 32 % de l'œuf plein.

Cela est valable pour le premier lot d'œufs reçus et sur lequel ont été faits tous les premiers dosages chimiques de l'œufs plein et des coques.

Œufs légers. — Ces œufs sont plus légers et plus clairs que les précédents. J'ai pensé que cela pouvait provenir d'une différence dans l'épaisseur de la coque plutôt que dans la composition de l'embryon lui-même (bien que celle-ci puisse changer d'un lot à l'autre en fonction du temps d'immersion de l'œuf après la fin de sa diapause).

Aussi, des numérations d'œufs pleins et de coque vides ont été refaites dans les mêmes conditions que précédemment.

Voici les résultats :

œuf total : 2,6 γ
coque vide : 0,6 γ

On voit quelles grosses différences peuvent être observées : l'embryon est plus petit (2 γ au lieu de 2,7 γ) et la coque ne représente plus que 23 % de l'œuf total.

Ces différences entraînent évidemment des modifications dans le calcul de la composition de l'embryon.

En conséquence, il semble impossible d'attacher une importance et une signification certaine à des variations de faible amplitude observées dans l'évolution de la composition de l'embryon. Seules, des variations de grande amplitude, ne pouvant être attribuées à des erreurs commises au cours des mesures ou des calculs, seront jugées significatives.

2° Composition de la coque.

Les coques triées comme il a été indiqué précédemment, contiennent encore quelques œufs ; il a été impossible de les séparer. Comme ils ne représentent qu'un faible pourcentage, il n'en est pas tenu compte dans les résultats ; ils entraînent par leur présence une légère erreur par excès, surtout dans les résultats se rapportant aux constituants principaux de l'embryon, tels que glucides et lipides.

Sur les coques ont été dosés les principaux groupes des constituants vitellins de l'embryon, ainsi que les constituants spécifiques de la coque (pigments et chitine).

Lipides. — Un poids connu de coques finement pulvérisées en présence de sable et imbibées d'alcool, est extrait au micro-Kumagawa : la légèreté des coques et leur faible mouillabilité, même par l'alcool, sont fort gênantes ; la poudre de coque risque, dans ces conditions, d'être entraînée par l'alcool avec l'extractif.

Les coques renferment : 6,6 % de substances lipidiques.

Glucides totaux. — Seuls les glucides totaux ont été dosés par la méthode de G. Bertrand après une hydrolyse de trois heures par l'H Cl 2N.

Dans ces conditions, la chitine éventuellement présente n'est pas hydrolysée (des hydrolyses témoins sur de la chitine pure le montrent).

On dose ainsi non seulement les glucides proprement dits (qui doivent être en faible quantité), mais encore les substances réductrices en général.

Résultats : 4,4 %.

La chitine. — Dans une première série de dosages, les déterminations ont été faites sur les œufs totaux.

L'œuf total contient 3 % de chitine (2,9 % exactement), ce qui entraîne un pourcentage de 9 à 10 % de chitine dans la coque.

Une autre série de dosages a été faite sur les coques proprement dites et a donné des résultats similaires.

L'observation microscopique des coques traitées par la potasse, montre que la chitine constitue la mince enveloppe interne sécrétée en dernier lieu par l'embryon.

Azote total. — L'azote total s'élève à 8,75 %; 0,7 % de cet azote est attribuable à la chitine et non aux protides. En conséquence, en appliquant le coefficient 6,25 (coefficient probablement trop faible), la coque renfermerait 50 % de protides.

Résidu de calcination. — Il est seulement de 2,5 %.

Le calcium. — Le taux de calcium est seulement de 0,12 %; la coque n'est donc pas calcifiée (l'œuf total n'en contient que 0,2 %). L'HCl ne provoque d'ailleurs aucun dégagement gazeux.

Le fer. — Le dosage au sulfocyanate donne un taux de 0,28 %. Ce taux est considérable : il correspond à un taux de 3,1 % *d'hème* (nous verrons plus loin l'importance de ce résultat).

Le sodium et le potassium. — Ils sont dosés par photométrie de flamme, dans les liquides de destruction nitroperchlorique ou sulfo-perchlorique.

Na	0,11 %
K	0,16 %

La coque, malgré un lavage à l'eau distillée, retient donc des sels, sans doute dans ses alvéoles.

Le phosphore.

P total	0,46 %	P minéral	0,33 %
		P organique	0,13 %

Les pigments. — Vus en masse, les œufs durables sont nettement colorés en brun. Cependant, à la loupe binoculaire, leur coloration varie du brun clair au brun chocolat. Les œufs du premier lot observé étaient, dans l'ensemble, extrêmement sombres ; il en est de même de ceux recueillis dans les élevages. Par contre, les œufs du commerce des derniers lots étaient, dans l'ensemble, beaucoup plus clairs.

Nous avons vu l'importance attachée par Lochhead à l'épaisseur de la coque : si cette coque brune ne se forme pas, la femelle, vivipare, donne naissance à des nauplius ; si elle se forme, la femelle pond des œufs soit durables, soit immédiats. L'élimination d'un pigment brun par les glandes coquillières maternelles joue-t-elle un rôle dans l'avenir de l'embryon ? En tout cas, quelle est la nature de ce pigment ?

Sa couleur brune, la teneur élevée en Fe de la coque, et la présence tout au moins épisodique, d'hémoglobine dans le sang de l'adulte (cf. p. 94) font penser à une nature hémoglobinique.

Recherche des porphyrines. — La présence des pigments bruns de nature phorpyrinique est courante dans le règne animal, tout particulièrement dans les coques et les coquilles d'œufs. Elles ont été recherchées :

1° Par observation directe en lumière U. V.,

2° Après essai d'extraction acide et observation en lumière U. V.

Résultats. : Ils ont toujours été négatifs.

Recherche du noyau hème. — Le pigment de la coque présente les caractères de solubilité suivants :

1° Il est insoluble dans l'eau, les solvants organiques (en particulier la pyridine), les solutions salines, les solutions acides même concentrées.

2° Il est soluble dans les solutions alcalines : la solution est verte si elle est diluée, et rouge ambré si elle est concentrée. La dissolution est d'autant plus aisée que la solution alcaline est plus concentrée (KOH, Na OH à 10 ou 20 %).

3° L'acide acétique cristallisable, à l'ébullition, libère le pigment qui devient alors soluble dans la pyridine en donnant une solution d'un beau rouge.

Après traitement par l'alcool bouillant, il présente les mêmes caractéristiques.

Ces caractères, spécialement le troisième, semblent montrer la présence, soit d'une hémoglobine, soit d'un chromoprotéide très voisin renfermant le noyau hème.

L'étude spectroscopique va préciser ces résultats.

Le spectre d'absorption a été fait :

1° sur la solution alcaline,

2° sur la substance obtenue par précipitation acide de la solution alcaline précédente,

3° sur la solution pyridinique provenant de l'attaque par l'acide acétique cristallisable à l'ébullition.

A. — En traitant un lot d'œufs ou de coques par la potasse à 10 %, soit à chaud pendant quelques minutes, soit à froid pendant plusieurs heures, on obtient une solution rouge-brun qui présente le spectre d'absorption suivant : un maximum d'absorption à 435 mμ et une bande diffuse vers 600 mμ.

Ce spectre est caractéristique de l'hématine.

B. — La solution précédente est traitée par l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que le milieu devienne acide. On obtient ainsi un précipité ; il est filtré, lavé à plusieurs reprises sur le filtre, puis desséché à l'étude. Ce précipité brun noirâtre est insoluble dans l'eau, soluble dans les solutions alcalines, en redonnant la solution précédente, et soluble dans la pyridine en donnant une solution d'un rouge franc.

Cette solution présente le spectre d'absorption de l'hémine à l'état réduit : une bande maxima à 435 mμ et deux bandes à 545 et à 577 mμ (graph. 1).

C. — Enfin, l'extrait pyridinique obtenu après traitement par l'acide acétique cristallisé à l'ébullition, présente également le spectre de l'hémine à l'état réduit.

En conclusion, la coque brune de l'œuf durable paraît devoir sa couleur à un chromoprotéide voisin de l'hémoglobine ou même peut-être à un dépôt d'hémoglobine. En effet, si l'on considère que le noyau hème contient 9 % de Fe, la coque qui renferme 0,28 % de Fe, contiendrait 3,1 % d'hème.

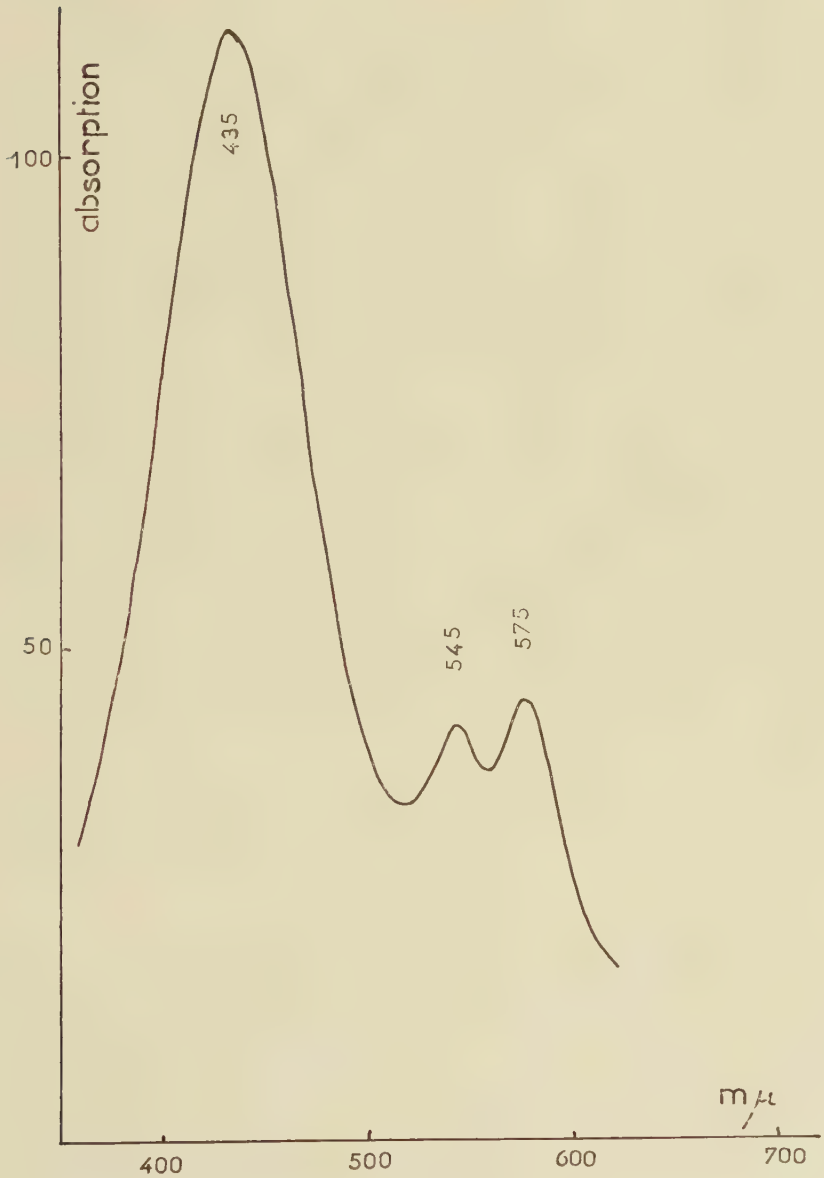
Plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence dans le sang de l'adulte, de l'hémoglobine en quantité variable. Il est légitime de penser que cette hémoglobine et son élimination par les glandes coquillières de la femelle, jouent un rôle important dans la formation des œufs durables (voir p. 105).

Conclusions.

Quantitativement, la coque renferme :

Glucides	4,4 %
Lipides	6,6 %
N total	8,75 %
Cendres	2,5 %
Fe	0,28 %

Na	0,11 %
K	0,16 %
Ca	0,12 %
P total	0,46 %
P minéral	0,33 %
Chitine	10 %



GRAPHIQUE I. — Spectre d'absorption de l'hémine extraite des coques (solution pyridinique).

L'œuf total renferme donc un certain pourcentage de chacune de ces substances attribuables à la coque.

	Œufs légers (23 % de coque)	Œufs lourds (30 % de coque)
Glucides	1 %	1,32 %
Lipides	1,5 %	1,92 %
N total	2 %	2,625 %
Calcium	0,04 %	0,04 %
Chitine	3 %	3 %

Morphologiquement, l'embryon est entouré de deux enveloppes distinctes :

1° *Une coque externe*, épaisse, sécrétée par les glandes coquillières de la mère, de nature protidique, d'aspect alvéolaire (Mathias) et imprégnée extérieurement d'une quantité variable d'un dérivé de l'hémoglobine ;

2° *Une enveloppe interne, mince* et incolore, constituée par de la chitine, représentant seulement 10 % de la coque totale. C'est une sécrétion embryonnaire, car elle se forme lorsque la coque est déjà bien constituée.

En surface, on observe également une très mince enveloppe transparente, de nature indéterminée.

Au moment de l'éclosion, l'ensemble coque protéique plus enveloppe chitineuse, est abandonné par l'embryon ; celui-ci est encore entouré d'une très mince enveloppe transparente, dont il se libère en quelques heures.

3° Composition de l'œuf total.

Les substances lipidiques.

Technique et fractionnement des réserves embryonnaires. — Un poids connu d'œufs durables est très finement broyé en présence de sable, puis soumis à l'extraction alcoolique dans un micro-Kumagawa. Une parfaite pulvérisation est indispensable, car les lipides passent très mal à travers la coque. Des dosages témoins effectués sur les œufs non pulvérisés l'ont montré (les résultats sont de deux à trois fois plus faibles).

Après traitement de l'extractif alcoolique suivant la technique précédemment indiquée, les constituants de l'œuf total sont fractionnés

en trois groupes de substances de solubilités fort différentes dans l'alcool et le benzène.

1° Substances solubles dans le benzène à froid : lipides proprement dits et insaponifiable (en particulier hydrocarbures tels que les caroténoïdes).

2° Substances passant dans l'alcool bouillant mais insolubles dans le benzène ; ces substances passent dans l'extractif alcoolique, soit grâce à leur solubilité dans l'alcool bouillant, soit grâce aux petites quantités d'eau présentes dans le matériel soumis à l'extraction alcoolique.

Ces molécules solubles dans l'alcool sont obligatoirement de petite taille : sels minéraux, glucides tels que mono- et diholosides, peptides de petite taille et amino-acides.

3° Le résidu restant dans la nacelle après l'extraction est constitué par les substances insolubles dans l'alcool. Elles ont un poids moléculaire élevé : ce sont les holoprotéides, les hétéroprotéides (chromoprotéides de la coque), le glycogène, la chitine.

Ce fractionnement des principaux constituants de l'embryon permet une analyse plus fine de ceux-ci. C'est ainsi que l'azote total est scindé en azote protéique et en azote non protéique ; les glucides totaux en polyholosides (glycogène) et en sucre de faible poids moléculaire (glucose et diholosides non réducteurs tels que le tréhalose).

Résultats.

Lipides totaux. — Des résultats très sensiblement différents ont été obtenus avec les œufs des deux séries qui ont déjà été signalées (œufs lourds et œufs légers).

L'ensemble des résultats est donné dans le tableau II.

Nous verrons plus tard, au moment d'établir la constitution de l'embryon, l'explication de ces différences dans les résultats.

Acides gras et insaponifiable. — L'extractif benzénique précédent est traité suivant la technique courante.

Il contient :

Acides gras	59 à 63 %
Insaponifiable	4,8 %

L'insaponifiable, très fortement coloré en jaune, contient des pigments caroténoïdes dont nous parlerons plus loin.

Phosphore lipidique et phosphore total. — Les lipides renferment 0,57 % de P, ce qui représente 0,06 % par rapport au poids total.

En fait, le P se retrouve dans le résidu protéique provenant de l'extraction des lipides : ce résidu en contient 1,045 %, soit 0,71 % du poids total.

Par ailleurs, le dosage direct du phosphore total donne une teneur de 0,75 % de P total ; ce résultat est bien en accord avec les précédents.

0,10 % de ce P, extractible par les acides, paraît être minéral et localisé dans la coque (celle-ci en renferme bien en effet 0,33 %, ce qui est parfaitement concordant).

Caroténoïdes. — Depuis longtemps la présence d'un pigment jaune orangé, probablement de nature caroténoïde, a été signalé dans l'œuf durable d'*Artemia* par NEEDHAM (80). Il signale sa présence en indiquant que son taux paraît augmenté chez les nauplius.

« Il est probable que les lipides sont synthétisés par l'embryon, car il y a plusieurs exemples de synthèses des acides gras pendant le développement de certains œufs aquatiques. Il est certain que le pigment orange est synthétisé pendant le développement. En effet, il est beaucoup plus apparent dans le nauplius que dans les œufs, et le premier donne un extrait alcoolique d'un rouge orangé foncé qui contraste avec le jaune pâle du dernier. »

Ces indications assez vagues demandent des précisions.

Plusieurs questions peuvent se poser au sujet de la présence de ces pigments dans l'embryon :

1° La couleur orangée de l'embryon est-elle due à un seul pigment ou bien à un mélange de plusieurs pigments ?

Tableau

	Poids sec total des lots	Résidu	
		Pds g.	%
Œufs lourds (moyenne de 13 mesures)..	49,830	34,66	*68,83*
Œufs légers (moyenne de 4 mesures) ...	1,843	1,112	*60*

2° Quelle est la nature de ce ou de ces pigments ? Proviennent-ils de la nourriture végétale de la mère sans avoir subi de transformation (carotène, xanthophylle, etc...) ?

Ou bien, tout en provenant de la nourriture maternelle, ont-ils été transformés de façon à acquérir une structure qui ne se rencontre que chez les caroténoïdes animaux ? En fait, ces caroténoïdes animaux, très répandus chez les crustacés, sont représentés essentiellement par l'*astacène* et par quelques dérivés dont on ne peut affirmer qu'ils en diffèrent beaucoup (acide astérinique, actinioéritrine, glycymérine, etc...) (Lederer (67), Karrer et Jucker (63)).

3° Quelle est leur origine ? Sont-ils purement exogènes, provenant de la nourriture végétale ? ou endogènes, étant synthétisés par l'organisme animal, comme le suggère le travail déjà ancien de Needham ?

Une telle question ne se pose pas pour les organismes supérieurs chez lesquels il est bien reconnu que les pigments caroténoïdes ne peuvent être synthétisés. Pour de nombreux auteurs, il en est de même chez les animaux inférieurs, mais cela n'est pas prouvé d'une façon certaine ; pour Karrer et Jucker, il serait intéressant d'étudier le rôle de la nourriture sur les caroténoïdes des animaux inférieurs.

Chez *Artemia salina*, la présence de caroténoïdes dans la nourriture m'a paru indispensable à l'apparition de caroténoïdes chez l'adulte et chez l'embryon (v. p. 101).

Nous essaierons de répondre ici aux deux premières questions en utilisant les trois méthodes suivantes : étude du spectre d'absorption, chromatographie sur colonne et partage entre solvants.

Spectre d'absorption. — Les caroténoïdes végétaux possèdent plusieurs bandes d'absorption (au moins deux et souvent trois) ; seul l'astacène et quelques pigments voisins, spécifiques de l'organisme animal,

Extr. alcool total		Extr. hydrosol.		Lipides	
Pds g.	%	Pds g.	%	Pds g.	%
14,898	*29,3*	9,475	*18,8*	5,277	*10,45*
0,730	*40*	0,389	*22*	0,341	*18*

possèdent une seule bande d'absorption située à 500 mμ environ. Cette propriété est très spécifique ; d'après Lederer (67), elle serait due à la présence dans leur molécule, de groupements cétoniques : ceux-ci proviendraient de l'oxydation par l'organisme animal du caroténoïde végétal exogène.

Technique. — Les œufs desséchés et broyés en présence de sable, sont extraits par divers solvants : pyridine, chloroforme, alcool, éther de pétrole. Après filtration, les solutions sont passées au spectrophotomètre.

Résultats. — Dans tous les cas, je n'ai obtenu qu'une seule bande, large et située aux environs de 500 mμ (graph. II).

Pyridine	500 mμ à 505 mμ
Ether de pétrole	480 mμ à 485 mμ
Alcool	495 mμ
Chloroforme	500 mμ

Ce spectre, à une seule bande, est très caractéristique de l'astacène et suffit à l'identifier.

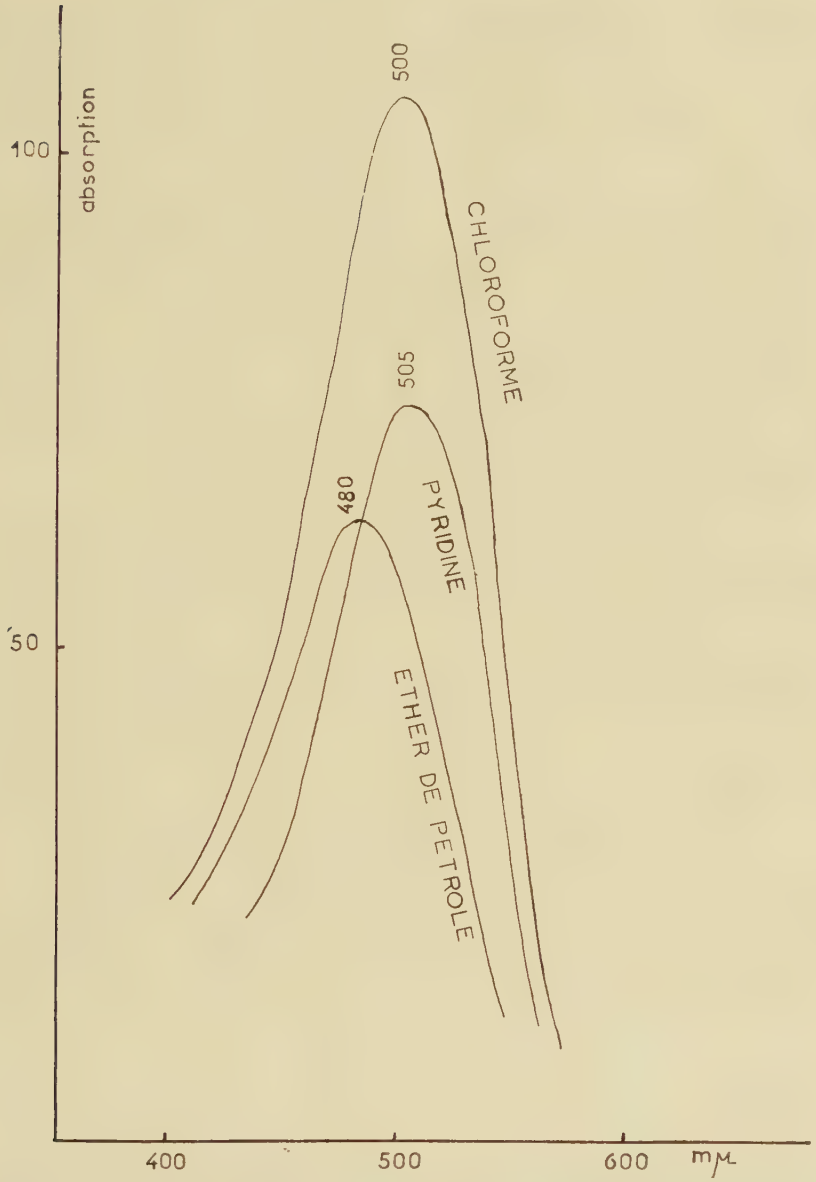
D'après le spectre, l'œuf contiendrait donc un seul pigment, l'astacène.

La forme du spectre obtenu est très nette et ne peut être due à la superposition de plusieurs spectres à deux ou trois bandes qui fusionneraient pour former une bande continue. Cependant, pour plus de sécurité, j'ai extrait le carotène d'un broyat de carotte et en ai fait le spectre dans les solvants utilisés précédemment. On voit très nettement un spectre à deux bandes pour chacun des solvants utilisés.

Ether de pétrole	470 mμ et 490 mμ
Pyridine	485 mμ et 510 mμ
$CH\,Cl_3$	483 mμ et 505 mμ
$C_6\,H_6$	480 mμ et 505 mμ

Un mélange témoin, environ à parties égales de pigments des œufs et de carotène, montre encore un spectre à deux bandes, bien que celles-ci soient plus faiblement séparées.

Le carotène peut donc être détecté en présence d'astacène, lorsque sa proportion dans le mélange est assez grande. Ajoutons que les solutions pyridinique sont d'un rouge framboise et contrastent avec une solution de carotène qui, dans ces conditions, est orangé franc. Les résidus d'évaporation sont jaune orangé ; le carotène est jaune franc.



GRAPHIQUE II. — Spectre d'absorption des pigments caroténoïdes de l'œuf dans divers solvants organiques : spectre à une seule bande caractéristique de l'*astacène*.

Enfin, avec l'acide sulfurique concentré, le résidu d'extraction des œufs donne une couleur bleue, fugace, mais intense.

Nous pouvons donc dire que l'embryon d'*Artemia* renferme des

caroténoïdes constitués *en majeure partie par de l'astacène*. Mais il est possible qu'il existe, à côté de l'astacène, d'autres pigments en petite quantité, dont le spectre passe inaperçu. C'est pour cela que j'ai alors effectué le partage entre solvants et la chromatographie sur colonne.

Partage entre solvants. — J'ai utilisé la technique employée par Lederer pour la recherche et l'identification des caroténoïdes chez les animaux inférieurs (67). Cette méthode, bien qu'imparfaite, permet un enrichissement de chacune des phases en pigments qui lui sont propres.

Opérer de la façon suivante :

1° Extraction des œufs, broyés en présence de sable, par 20 cm^3 d'acétone en plusieurs fois. On obtient ainsi un liquide fortement coloré en jaune orangé.

2° Extraction de l'acétone par l'éther de pétrole.

Aux 20 cm^3 d'acétone, ajouter 20 cm^3 d'éther de pétrole et q. s. d'eau distillée pour obtenir la séparation des deux phases. Après agitation et repos, on obtient deux couches distinctes. Eliminer la couche inférieure acétonique.

La phase éthérée est fortement colorée en jaune orangé ; la compléter si besoin à 20 cm^3.

Ajouter 20 cm^3 de méthanol à 90 %. Agiter à plusieurs reprises puis laisser reposer. On obtient :

— une couche supérieure *éthérée* de couleur orangée : *épiphase*,

— une couche inférieure *méthanolique*, rosée : *hypophase*.

L'épiphase contient théoriquement des carbures, des composés à un oxygène (carotène), des esters de xantophylle, quelques esters d'astacène et des composés à $O\text{-}CH_3$.

L'hypophase contient : la xantophylle libre à plus de un OH, l'*astacène*, quelques esters d'astacène et des acides.

Théoriquement, l'astacène est donc trouvé presque entièrement dans la phase inférieure méthanolique. A l'addition de petites quantités d'eau, le pigment est facilement transféré dans l'éther de pétrole.

En réalité, on retrouve des pigments dans les deux phases, surtout si le degré d'hydratation n'est pas rigoureusement respecté.

Aussi, j'ai recueilli les deux phases. Après évaporation et redissolution dans l'éther de pétrole, j'ai fait le spectre de chacune d'elle ; dans les deux cas, le spectre obtenu (bande entre 480 et 485 mμ) est très nettement celui de l'astacène, à l'exclusion de tout autre.

Des saponifications opérées sur chaque phase (éthérée et méthanolique) ont montré que l'astacène était surtout passé dans la phase éthérée.

Chromatographie sur colonne : Technique. — L'absorbant choisi est l'alumine (R. P. pour chromatographie). Il est placé dans un tube de verre fixé sur une fiole à vide, d'après la technique classique (Loiseleur (72), Karrer et Jucker (63)). Les pigments sont, soit en solution dans l'éther de pétrole, soit dans un mélange benzène-éther de pétrole.

Résultats. — Dans tous les cas on observe la présence sous forme d'anneau, d'un seul pigment rouge, très fortement absorbé dans la partie supérieure de la colonne : ceci est caractéristique de l'astacène.

Si la liqueur éthérée ou éthéro-benzénique étudiée est additionnée d'un extrait éthéré ou éthéro-benzénique de carotène, celui-ci n'est pas retenu dans les conditions de l'expérience et passe à travers la colonne, alors que le pigment de l'œuf est retenu dans le sommet de la colonne comme précédemment.

De plus, utilisant un extrait éthéro-benzénique d'œufs, j'ai recueilli les fractions qui passaient à travers la colonne, afin de savoir si tous les pigments étaient retenus par l'alumine. En fait, j'ai recueilli trois fractions à des temps divers : la première est entièrement dépourvue de pigments ; les deux dernières en contiennent de toutes petites quantités, mais leur spectre d'absorption dans l'éther de pétrole est encore celui de l'astacène. Une très petite fraction de celui-ci est donc passée à travers la colonne ; il ne s'agit pas d'un autre caroténoïde.

Conclusion. — La chromatographie sur colonne d'alumine permet de conclure que les pigments caroténoïdes de l'œuf durable d'*Artemia* sont constitués uniquement d'*astacène*, à l'exclusion de tout autre pigment en quantité décelable.

Les glucides.

A. *Les glucides totaux.* — Les premières mesures effectuées sur les œufs lourds par la méthode de G. Bertrand (après hydrolyse de trois heures par HCl 2N), donnent une moyenne de 12,5 % de glucides totaux (exprimés en glucose), (huit mesures).

Dans les mêmes conditions, les œufs légers ont montré un taux légèrement plus élevé, proche de 14 % (trois mesures).

La méthode de Folin-Wu, sur les œufs légers, donne une moyenne de 14 % (neuf mesures).

B. *Glycogène.* — Le dosage est fait d'après les techniques indiquées précédemment, après pulvérisation soignée des œufs, dont l'enveloppe de chitine, inattaquable par la KOH même concentrée, empêcherait la dissolution du glycogène.

Œufs lourds : Huit mesures effectuées en utilisant le dosage du glucose par le G. Bertrand et nécessitant par là une grande quantité de matériel, donnent une moyenne de 2,11 %.

La microméthode de Folin-Wu donne un pourcentage plus élevé : 2,75 %.

Cette dernière méthode paraît plus correcte : en effet, l'erreur pourrait provenir du fait suivant : dans la première méthode, l'extraction est faite par la KOH 1 % : des protéines sont extraites qui précipitent avec le glycogène en milieu alcoolique ; ce coagulum abondant serait susceptible de protéger partiellement le glycogène au cours de l'hydrolyse acide ultérieure. Dans la deuxième méthode, l'extraction étant faite par la potasse 30 %, seul le glycogène précipite. Il est malheureusement impossible, dans la première méthode, d'utiliser de la potasse 30 %, car le volume du liquide obtenu après addition d'alcool serait beaucoup trop grand pour une centrifugation pratique et quantitative.

Le dosage du glycogène sur le résidu d'extraction des lipides donne un taux de 3,2 %, ce qui correspond à peu près aux résultats précédents.

Œufs légers : Le taux de glycogène est nettement plus bas : 1,17 % seulement. Cette différence est certaine, car elle se retrouve sur des œufs lourds et légers faisant partie des mêmes séries de dosages.

Nous voyons, d'après ces résultats, que l'œuf durable, très riche en glucides totaux, mais pauvre en glycogène, contient en grande quantité un glucide ou un mélange de glucides dont il serait intéressant de connaître la nature. Le paragraphe suivant est consacré à son identification.

C. *Le Tréhalose.* — Le résultat de l'analyse des lipides montre que la fraction extractible par l'alcool bouillant et insoluble dans le benzène, est très importante : 19 % environ de l'œuf total.

Nous l'avons appelé « extractif ». Nous venons de voir qu'une grande partie des glucides de l'œuf (10 à 12 % du poids de l'œuf) n'étant pas du glycogène, reste indéterminée. Il paraît légitime de penser que ces glucides indéterminés constituent une grande partie de l'extractif.

Étant donné leur importance quantitative, j'ai cherché à déterminer leur composition. A priori, cet extractif ne peut contenir que des sels minéraux, entraînés par les petites quantités d'eau présentes, des acides aminés et des peptides, des glucides de faible poids moléculaire, du glucose en particulier. Chez les Annélides, Durchon et Lafon (26) ont trouvé également des proportions très élevées de ces extractifs ; ceux-ci n'étant pas glucidiques, ils ne paraissent pas comparables à ceux d'Artemia.

Aspect macroscopique de l'extractif : Si on extrait à l'alcool bouillant un poids important d'œufs, on obtient une solution alcoolique. Cet extractif, après évaporation et extraction des lipides par le benzène, se présente sous forme d'une substance solide, dure et cassante, transparente et légèrement colorée en brun clair. Il paraît être constitué en majeure partie par une substance homogène à laquelle seraient mélangées quelques impuretés.

Cette substance est extrêmement soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool à 80°, mais non dans l'alcool absolu.

Par calcination, elle donne un résidu charbonneux très important ; elle ne contient donc pas de sels minéraux en grande quantité, mais, par contre, une substance organique.

Le dosage d'azote total n'indique que des traces d'N ; ce ne sont donc pas des amino-acides.

Recherche des glucides : La solution obtenue par dissolution de l'extractif, ne réduit pas la liqueur de Fehling : elle ne contient donc pas de glucose ou autre sucre réducteur.

Mais, après une hydrolyse de trois heures par H Cl 2N, les dosages par la technique de G. Bertrand donnent une teneur de l'extractif, exprimé en glucose, d'au moins 50 à 60 %.

De ces résultats encore grossiers, il apparaît que l'œuf durable contient une grande quantité d'une substance inconnue, probablement un glucide non réducteur, mais devenant réducteur après hydrolyse et de faible poids moléculaire. Notons que n'importe quelle substance réductrice pourrait réduire la liqueur de Fehling, sans être, pour cela, un ose.

Préparation et cristallisation : Puisque l'œuf en contient des quantités importantes, j'ai cherché à l'extraire en abondance. Pour éviter une extraction à l'alcool bouillant, qui est longue et risque d'altérer la substance, il est préférable d'opérer à froid : on pulvérise très finement

les œufs (4 à 5 g par exemple) en les broyant au mortier en présence de sable ; on les laisse en contact avec de l'alcool à 70-80° pendant une heure en agitant de temps en temps ; après un deuxième épuisement et filtration de la liqueur alcoolique, celle-ci est évaporée au B. M. Le résidu est alors dissous de nouveau dans l'eau distillée.

Une évaporation rapide à l'étuve ou au B. M., donne le résidu amorphe, dur et transparent, légèrement coloré en brun dont j'ai déjà parlé.

Par contre, une évaporation lente à la température du laboratoire, ou mieux, au frigidaire, donne de nombreux cristaux. Ces cristaux, qui peuvent être très gros (5 à 8 mm facilement), sont souvent réunis en mâcles étoilées. Ils sont incolores, transparents, pratiquement sans saveur, très solubles dans l'eau et l'alcool fort.

Une nouvelle dissolution dans l'eau ou l'alcool suivie d'une cristallisation, permet de les purifier. Je n'ai pas poussé plus loin la purification, car chaque recristallisation fait perdre un pourcentage important de substance.

Nature des cristaux : Les cristaux dissous dans l'eau distillée, ne réduisent pas la liqueur de Fehling, mais après hydrolyse par HCl 2N, ils la réduisent fortement. Ce sont donc eux qui constituent la majeure partie de l'extractif.

Ce corps se trouve à l'état libre dans l'œuf ; il n'y est pas combiné à des protéines, par exemple, que l'extraction alcoolique séparerait. En effet, un broyat d'œufs, mis en suspension dans de l'eau distillée, est placé dans un sac en collodion, puis mis à dialyser contre de l'eau distillée ; au bout de quelques heures, le liquide de dialyse réduit la liqueur de Fehling après hydrolyse.

Mais la méthode de G. Bertrand est basée sur la propriété réductrice des glucides ; elle est donc commune à toutes les substances réductrices. Aussi, elle ne peut permettre d'affirmer que la substance hydrolysable est un glucide et encore moins d'en déterminer la nature.

Le liquide d'hydrolyse acide des œufs totaux, traité par l'acétate de phénylhydrazine, donne naissance à des cristaux de glucosazone uniquement : ceci parait indiquer la présence prépondérante, sinon exclusive de glucose dans l'hydrolysat.

Pour identifier le glucide original présent dans les œufs, j'ai eu recours à la chromatographie sur papier du liquide d'hydrolyse des cristaux. Cette méthode permet simultanément la séparation et l'identification des glucides éventuellement présents.

Technique (Lederer, Lederer (68), Loiseleur) :

Phase liquide : Les chromatogrammes ont été réalisés sur papier Whatman n° 4, à 20°, par la méthode descendante d'écoulement continu en milieu de Partridge (butanol, acide acétique, eau (4, 1, 5)).

La partie inférieure de la feuille de papier est découpée en dents de scie, afin de permettre un écoulement continu régulier dans toutes les parties de la feuille.

Révélateur : Sur les chromatogrammes sont essayées deux séries de révélateurs :

1° Le *phtalate d'aniline* qui révèle les aldohexoses et les aldopentoses ; formule :

Aniline	0,93 g
Acide phtalique	1,66
Butanol saturé d'eau	q. s. p. 100 cm³

2° L'*urée chlorhydrique :* qui permet la révélation des cétohexoses sur le chromatogramme sur lequel ont déjà été révélés les aldopentoses et hexoses par le phtalate d'aniline ; formule :

Urée	5 g
HCl, 2 N	20 cm³
Ethanol	80 cm³

Résultats : Dans tous les cas, une seule tache, c'est-à-dire un seul ose, a été ainsi révélé par le phtalate d'aniline.

Identification. — Des témoins externes et, mieux, internes, de glucosamine et de maltose, montrent que ces deux substances ont un Rf bien différent du glucide inconnu. Mais ce dernier possède le même Rf que le glucose. Plusieurs chromatogrammes à témoins internes et externes montrent que le glucide recherché est bien du glucose.

Une hydrolyse ménagée par HCl montre la libération de quantités progressivement croissantes de glucose (par chromatographie d'une goutte de liquide d'hydrolyse prélevée de 5 minutes en 5 minutes). Il n'apparaît jamais que du glucose. Il est à noter que ce n'est qu'au bout de 15 minutes qu'une quantité suffisante pour la révélation est libérée pour l'hydrolyse ; celle-ci est donc assez lente.

Des dosages par la méthode de G. B. de poids connus de cristaux ont donné une composition de 90 à 93 % de glucose.

La substance est donc un diholoside, ou, au maximum, un triholoside, non réducteur et dont la molécule est formée uniquement de glucose.

Parmi les glucides connus, seul le tréhalose possède des propriétés identiques à celles de la substance étudiée. Formé de deux molécules de glucose, il n'est pas réducteur, cristallise en gros cristaux avec deux molécules d'eau (dans ce cas, la molécule renferme 91 % de glucose) et est soluble dans l'alcool. Le tréhalose cristallisé à deux H_2O, a un pouvoir rotatoire de + 175°.

Les cristaux étudiés ont donné un pouvoir rotatoire de + 72°. Aux erreurs de mesure près, le corps étudié et le tréhalose ont donc le même pouvoir rotatoire.

Pour l'identification définitive, je me suis encore adressée à la chromatographie sur papier.

Comme précédemment, j'ai utilisé la chromatographie continue en milieu butanol-acide acétique-eau.

Révélation. — Comme le tréhalose n'est pas réducteur, il n'est pas révélable par le phtalate d'aniline.

J'ai essayé de le révéler après hydrolyse in situ par l'acide trichloracétique, d'après la technique utilisée par Guichard (57) pour la révélation du saccharose dans la vigne. Malheureusement, le tréhalose n'est pas assez rapidement hydrolysé pour permettre cette méthode que j'ai dû abandonner. J'ai alors adopté une méthode qui a l'avantage de pouvoir être grossièrement quantitative.

Sur une feuille de papier Whatman n° 4, je pose trois gouttes de trois solutions différentes : l'une du glucide étudié, l'autre de tréhalose, la dernière d'un mélange des deux précédentes (témoin interne).

La chromatographie terminée, le chromatogramme est séché à l'air, puis le papier est découpé en petits rectangles soigneusement numérotés.

Chacun de ces petits rectangles de papier, placé dans un tube à essai, est mis à tremper dans un volume connu d'eau distillée pendant plusieurs heures. Au bout de ce temps, après agitation, on prélève un volume connu du liquide dans lequel a diffusé, s'il y a lieu, le tréhalose contenu dans le papier.

Après hydrolyse par un volume connu de SO_2H_4N pendant 1 heure 30 à 2 heures, on révèle la présence de glucose par la réaction de Folin-Wu.

Il est facile de reconstituer le chromatogramme et par conséquent la localisation du tréhalose et du glucide étudié.

J'ai ainsi obtenu la preuve que le glucide cherché était bien du tréhalose.

Conclusion. — La présence en abondance de tréhalose dans l'œuf d'un Crustacé m'a d'abord fort étonnée. La bibliographie m'apprenait alors (1957) que ce glucide existait dans le règne végétal (particulièrement dans les champignons et la levure) et non dans le règne animal ; il fallait toutefois excepter de cette règle les coques de tréhala sécrétées par un insecte, *Larinus*, et dans lesquelles Berthelot a découvert pour la première fois le tréhalose.

Une étude générale sur le tréhalose et la tréhalase par Myrbäck (1949), (77), si elle mentionne la présence de tréhalase dans le règne animal, même chez les animaux supérieurs, ne mentionne pas celle du tréhalose. Ce n'est que tout récemment que le tréhalose commença à être mis en évidence et identifié chez les Invertébrés.

Kuwana (1937) avait bien montré chez l'œuf de *Bombyx mori*, la présence d'un holoside non réducteur, donnant seulement du glucose à l'hydrolyse ; mais il ne l'avait pas identifié.

Il faut attendre Wyatt et Kalf (1956) (111), Wyatt, Loughheed et Wyatt (1956) (112) pour l'identifier dans plusieurs espèces d'insectes : les pupes et les larves de *Telea polyphemus* en sont particulièrement riches ; ils le mettent également en évidence chez *Platysamia cecropia*, *Bombyx mori*, *Diprion hercyniae*, *Aedes aegypti*, *Drosophila repleta*, *Oncopeltus fasciatus*, *Tribolium confusum*.

Fairbairn et Passey (1957) (34), Passey et fairbairn (1957) (82), le mettent en évidence et étudient ses localisations dans l'œuf enkysté et les tissus de l'adulte d'*Ascaris lombricoides*.

Fairbairn (1958) (32) l'identifie chez la larve d'un Nématode, *Porocaecum decipiens*, aux côtés du glucose et du glycogène ; c'est d'ailleurs ce dernier qui représente la majorité des réserves glucidiques qui s'accumulent lors des premiers stades du développement larvaire.

Tous ces auteurs s'étonnent, comme moi-même, de rencontrer du tréhalose dans le règne animal.

Aussi, Fairbairn le recherche et le dose dans 71 espèces de Nématodes parasites et d'Invertébrés (1958), (32).

Duchateau, Florkin et Gromadska (1958) (25), étudient les

fluctuations de son taux lors du développement chez *Bombyx mori* : « au cours de la période allant du 4me au 11me jours du cinquième âge, les valeurs de la tréhalosémie sont assez variables... A partir de la fin de la période d'alimentation, on observe une chute de la tréhalosémie, le minimum étant atteint au voisinage de la nymphose ; la tréhalosémie s'élève ensuite de nouveau progressivement au cours de la période allant du 3me au 11me jour de la vie nymphale. La tréhalosémie diminue ensuite légèrement avant l'éclosion de l'imago ».

Howden et Kilby (1956) (59) ont observé de même chez la nymphe de *Schistocerca gregaria*, au 5e stade, un accroissement de la tréhalosémie suivi d'une légère chute avant la mue finale donnant l'adulte.

Le tréhalose paraît donc jouer un rôle important comme glucide de réserve chez les Invertébrés ; il paraît jouer un rôle particulièrement actif chez les œufs enkystés et les larves au moment de la période nymphale. Sans doute possède-t-il une répartition beaucoup plus grande que celle soupçonnée jusqu'ici. Il serait certainement intéressant de le rechercher chez les animaux inférieurs et d'essayer de déterminer son rôle. Sa recherche chez les animaux supérieurs ne serait peut-être pas vaine. En effet, la tréhalase y a été mise souvent en évidence. Il faut rappeler ici que la tréhalase a été assez largement recherchée dans le règne animal en relation surtout avec les enzymes digestifs.

Bourquelot et Gley (1895) (11) trouvent de la tréhalase dans l'intestin grêle de lapin, mais non dans le sérum sanguin du chien, l'urine humaine et le pancréas de lapin. Fischer et Niebel (1896) (39) trouvent de la tréhalase dans l'intestin grêle de cheval et de bœuf. Par contre, ils n'en trouvent pas chez le mouton et la couleuvre à collier. Dans le cas du sérum sanguin, seul celui du poisson possède les propriétés d'hydrolyser le tréhalose, particulièrement les sérums de tanche et de carpe.

Beaucoup plus récemment, Willstaedt et Borgard (1946) (109), cherchant à obtenir la tréhalase en abondance afin d'essayer son action sur le bacille tuberculeux (en effet, la coque cireuse de celui-ci contient des esters lipidiques du tréhalose), la recherchent chez les animaux marins ; ils la trouvent dans le sérum de *Raniceps ranimus*, *Labrus berggylta ascan* et la muqueuse intestinale de *Cotus scorpus*. Le sérum d'*Homarus vulgaris* est très actif, celui de *Cancer pagurus* peu actif.

Frerejacque (44) a mis également la tréhalase en évidence chez certains insectes (Doryphore, Courtilière). La mise en évidence seulement

très récente du tréhalose s'explique par la difficulté de sa détection, puis de son identification, surtout lorsqu'il existe en faible proportion. Dans le cas d'*Artemia*, j'ai eu la chance de me trouver en présence de quantités qui ne pouvaient que difficilement passer inaperçues.

L'azote total et les constituants azotés de l'œuf : Protéines et amino-acides.

Nous avons vu qu'au moment de l'extraction par l'alcool bouillant en vue du dosage des lipides, le matériel est scindé en un résidu contenant les protéines et en un extractif contenant les amino-acides et les peptides de très faible poids moléculaire.

L'N total est dosé dans les œufs lavés, par la méthode de Kjehldal. L'N protéique est dosé dans le résidu. Connaissant le pourcentage du résidu par rapport au poids total, il est facile de calculer l'N non protéique par différence. Son très faible pourcentage rend malaisé son dosage direct sur l'extractif.

Résultats.

Les œufs lourds. — Dans ces œufs qui renferment 10,5 % de lipides et dont le résidu protéique représente les 68 % du poids total, on trouve :

N total	7,66 %
N dans le résidu	10,5 %
N protéique	7,22 %
N non protéique	0,44 %

Les œufs légers. — Le résidu représente les 60 % du poids total. Les résultats sont pratiquement identiques aux précédents :

N total	7,7 %
N dans le résidu	12,14 %
N protéique	7,28 %
N non protéique	0,42 %

Conclusions. — Le taux d'N total correspondrait à un taux de 48 % de protéines et amino-acides, si on applique le coefficient de 6,25, correspondant à un taux de 16 % d'N dans les protéines. Il est possible que ce coefficient soit trop faible. En tout cas, on peut dire que les œufs renferment environ 50 % de protéines.

Le taux d'N non protéique (0,43 % en moyenne, soit 5,5 % de l'N total) est extrêmement faible ; peut-être correspond-il à un faible méta-

bolisme protidique. Il m'a paru intéressant de déterminer la nature des amino-acides présents afin de pouvoir les comparer ultérieurement à ceux présents chez le nauplius et chez l'adulte.

Étude chromatographique des amino-acides de l'œuf total.

Technique. — *Les amino-acides libres ; extraction.* — Un poids connu d'œuf (1 g par exemple) est broyé en présence de sable et extrait par de petites quantités d'acétone chlorhydrique (HCl 1 %) pendant plusieurs heures (5 à 6), en renouvelant de temps en temps l'acétone chlorhydrique. On filtre alors le liquide d'épuisement et on évapore à l'étuve sous vide.

Le résidu d'évaporation est délipidé par l'éther de pétrole. Il est dissous dans de très petites quantités d'eau distillée (0,3 à 0,5 cm^3). L'échantillon est prêt pour la chromatographie. Le nombre de gouttes de liquide à déposer sur le papier du chromatogramme est déterminé par des essais préliminaires.

La chromatographie. — Les premières réalisées l'ont été à une dimension en milieu butanol-acétique-eau. Elles se sont avérées insuffisantes pour la séparation des nombreux amino-acides présents.

Aussi, la majorité des chromatographies, descendantes, ont été réalisées à deux dimensions, la première dimension étant réalisée en milieu butanol-ac. acétique-eau (4 ; 1 ; 5), la deuxième dimension en milieu phénol ammoniacal.

La révélation. — Le chromatogramme, soigneusement séché à l'air chaud de façon à ne plus contenir de solvant, est révélé par pulvérisation à sa surface d'une solution butanolique de ninhydrine à 0,1 %. Après séchage à 90° pendant 10 minutes, les taches plus ou moins violacées d'amino-acides apparaissent.

Les amino-acides des protéines. — L'hydrolyse des protéines est effectuée à l'autoclave à 105° pendant 24 heures, par l'HCl 6N.

Le liquide d'hydrolyse est évaporé sous hotte ; le résidu est extrait par l'acétone chlorhydrique. Après évaporation du liquide acétonique, le résidu repris par l'eau distillée est prêt pour la chromatographie. Dans ces conditions, le tryptophane est détruit ainsi qu'une partie de la sérine.

Résultats. — 1° *Amino-acides libres.* — Par ordre de grandeur grossièrement quantitative, on trouve : l'ensemble acide aspartique +

cystéique ; l'ensemble sérine + glycocolle (mal séparés), alanine, acide glutamique ; tyrosine, valine ; proline ; leucine, phénylalanine. L'arginine et la lysine passent généralement inaperçues ainsi que la thréonine.

2° *Amino-acides après hydrolyse.* — Acide glutamique, acide aspartique ; glycocolle + sérine ; valine, phénylalanine, leucine ; alanine ; proline, arginine.

Ces résultats seront comparés plus loin avec ceux obtenus chez le nauplius dans les mêmes conditions.

Les substances minérales.

Cendres. — 3,5 %.

Phosphore. — La méthode de Thivolle donne une moyenne de 0,725 % portant sur 7 dosages.

La méthode de Machebœuf-Delsal, qui permet d'opérer sur de très petites quantités de matériel, donne une moyenne de 0,752 % de P.

L'œuf total renferme donc 0,74 % de P, dont 0,10 % minéral sont attribuables à la coque.

Les chlorures. — Les œufs sont finement pulvérisés et la suspension de leur poudre est détruite par le mélange nitro-permanganique. Le Cl est dosé par la méthode de Charpentier-Volhard dans le liquide de destruction. Onze mesures donnent une moyenne de 0,242 %.

Le calcium. — Les dosages faits par manganimétrie donnent une moyenne de 0,2 %.

Le sodium et le potassium. — Le Na et le K sont dosés dans les liquides de destruction nitro-perchlorique ou sulfo-perchlorique par photométrie de flamme. Vingt mesures donnent une moyenne de 0,11 % de sodium et de 0,50 % de potassium.

Résumé de la composition de l'œuf.

Les œufs légers. — Ils sont constitués par 23 % de coques et 77 % d'embryon.

Ils contiennent :

Glucides	14	%	tréhalose : 12,5 % ; glycogène : 1,17 %
Lipides	17	%	renfermant 60 % d'acides gras et 4,5 % d'insaponifiable

N total	7,7	%	protéique : 7,3 % ; non protéique 0,4%
Chitine	3	%	
Cendres	3,5	%	
Cl	0,242	%	
Na	0,11	%	
K	0,50	%	
P	0,74	%	

Pigments : La coque est fortement imprégnée d'un chromoprotéide proche de l'hémoglobine.

L'embryon contient de l'astacène, pigment fréquemment rencontré chez les crustacés.

Les œufs lourds. — Ils sont constitués par 32 % de coque et 68 % d'embryon.

Glucides	12,5	%	glycogène : 2,75 % ; tréhalose : 9,75 %
Lipides	10,5	%	
N total	7,66 à 7,7	%	protéique : 7,3 % ; non protéique 0,4 %

4° Composition de l'embryon.

Nous avons vu qu'un certain pourcentage des constituants principaux de l'œuf total était dû aux constituants de la coque.

Cas de l'œuf léger. — On peut dire que l'embryon contient en définitive :

Glucides	16,8	%	glycogène : 1,5 % ; tréhalose : 15,3 %
Lipides	20	%	

Si l'on considère qu'il n'y a pas d'insaponifiable dans les lipides des coques, les lipides de l'embryon contiennent 5,2 % d'insaponifiable :

N total	7,4	%	N protéique : 6,87 % ; N non protéique 0,53 % soit 7 % de l'N total

Cas de l'œuf lourd dans lequel 32 % du poids total est attribuable à la coque :

Glucides	16,44	%	glycogène : 4,04 % ; tréhalose : 12,4 %
Lipides	12,5	%	
N total	7,47	%	N protéique 6,88 % ; N non protéique 0,587 %

P.....	0,9	%
Ca.....	0,16	%
Cl.....	0,31	%

Nous pouvons constater que ces œufs diffèrent non seulement par l'importance relative de la coque, mais aussi par la composition de l'embryon. L'embryon des œufs lourds renferme moins de lipides, moins de tréhalose, plus de glycogène que celui des œufs légers.

L'azote total protéique et non protéique, cependant, est à un taux sensiblement égal dans les deux sortes d'œufs. Nous essaierons d'interpréter ces différences plus tard grâce aux résultats obtenus sur l'œuf en cours de développement et chez le nauplius.

En résumé l'embryon est donc :

1° Assez riche en protéines, mais relativement pauvre en azote non protéique.

2° Riche en glucides dont la majeure partie est constituée par du tréhalose (85 % des glucides totaux) et le reste par du glycogène. Fautrez-Firlefyn (38), dans un travail histochimique, ne met pas en évidence le tréhalose : elle mentionne le glycogène synthétisé dans l'embryon pendant les premiers stades et utilisé par celui-ci dès la fin de la gastrulation ; pour elle, le glycogène serait la principale réserve glucidique : cependant, dans le vitellus, elle signale la présence très nette d'un polysaccharide autre que du glycogène et que les méthodes histochimiques ne peuvent identifier ; elle le suppose être un polysaccharide aminé : sans doute s'agit-il du tréhalose, pris à tort pour un polyholoside.

3° Riche en lipides, possédant un insaponifiable riche en astacène, caroténoïde très répandu chez les Crustacés, qui colore fortement l'embryon en orangé.

De ces réserves, quelle est celle qui sera utilisée de préférence par l'embryon au sortir de la diapause ? L'étude de l'œuf en immersion et du nauplius va nous le montrer.

B. — L'œuf en immersion.

L'étude de l'évolution de la composition de l'embryon, après la reprise du développement, mais avant l'éclosion, est indispensable ; en effet, les conclusions tirées de la comparaison de la composition de

l'embryon de l'œuf durable et de celle du nauplius, bien que capitales, peuvent être incomplètes.

Après l'éclosion, il est possible, et même très probable, que le métabolisme (et partant, peut-être la composition) de l'embryon soit perturbé et modifié par le milieu nouveau (eau de mer) dans lequel il vit à l'état libre, et dont il était précédemment isolé par la coque ; nous nous demanderons d'ailleurs quelle est la perméabiblité de la coque.

L'étude de l'embryon en immersion permettra donc de :

1° Vérifier les résultats obtenus sur le nauplius à l'éclosion ;

2° Dissocier les transformations subies par l'embryon avant l'éclosion et par le nauplius pendant l'éclosion. Ces dernières sont imputables en effet, d'une part à l'évolution normale (intrinsèque) du métabolisme (épuisement des réserves vitellines, par exemple) et, d'autre part, au changement brutal des conditions de vie (extrinsèque).

L'étude précédente de l'œuf en anhydrobiose est donc refaite sur des œufs qui ont subi une reprise plus ou moins avancée de leur développement, grâce à une immersion dans une eau de mer apte à les faire éclore et à assurer la survie de l'animal et son développement normal.

D'autre part, il m'a paru assez intéressant d'étudier cette même évolution chez des œufs immergés dans des solutions salines d'ions (K^+, Mg^{++}, Ca^{++}) qui, soit permettent l'éclosion mais non la survie de l'embryon, soit ne permettent pas cette éclosion.

1° Pénétration des ions.

Nous avons vu qu'il paraissait peu probable que la coque soit perméable aux ions présents dans l'eau de mer (v. p. 32).

J'ai essayé de résoudre cette question en faisant des dosages systématiques de Cl^-, de Na^+ et de K^+ dans des œufs ayant séjourné un temps plus ou moins long dans des solutions pures de Cl Na et de Cl K, ainsi que dans des embryons venant d'éclore, mais encore attachés à la coque, dans ces mêmes solutions.

Technique. — Immersion à 25° pendant 15 à 20 heures dans des solutions pures de Cl Na 58 °/₀₀ et Cl K 74 °/₀₀.

Les œuf recueillis sont lavés soigneusement à l'eau distillée et desséchés à l'étuve. Il faut prendre soin, quand on veut doser les ions des embryons à la sortie de leur coque, de ne pas séparer la coque de l'embryon ; les résultats des dosages n'auraient plus aucune valeur.

Résultats. — Ils sont résumés dans le tableau III :

Tableau III.

Lots		Œufs bruts	Immergés Cl K	Immergés Cl Na	Éclos Cl K	Éclos Cl Na
Sodium.....	N. P.	0,11	0,11	0,19	0,075	0,14
	S. P.	0,11	0,11	0,16	0,060	0,105
Potassium....	N. P.	0,52	0,60	0,54	0,66	0,50
	S. P.	0,50	0,54	0,50	0,62	0,50
Chlore.....		0,24	environ 0,22	de 0,23 à 0,27		

N. P. = après destruction nitroperchlorique. — S. P. = après destruction sulfoperchlorique.

Discussion. — Bien que les taux de Cl, de Na et de K semblent augmenter légèrement pendant l'immersion, il semble que ce phénomène soit imputable à une fixation de ces ions sur la coque (peut-être due à un lavage insuffisant), plutôt qu'à une pénétration effective dans l'embryon lui-même ; en effet, si nous considérons le cas de l'immersion dans le Cl Na par exemple, nous voyons une augmentation de Na^+, mais aucune variation n'est présentée par le K^+ ; ce même phénomène est observable dans le cas de l'immersion dans le Cl K où l'on n'observe pas de chute de Na^+.

En outre, nous avons vu que les coques, bien que lavées, contiennent un certain pourcentage de Na et de K, sans doute retenu dans les alvéoles de la région intermédiaire décrite par Mathias.

Par contre, dès que l'embryon sort de la coque et se trouve dans la solution pure de Cl K, on observe non seulement une élévation du K^+, mais également une perte en Na^+. Ce phénomène explique la mort instantanée de l'embryon par déséquilibre total de sa composition ionique. Ce déséquilibre ne s'observe pas dans le cas de l'éclosion de l'œuf dans une solution de Cl Na ; teneur en Na et teneur en K se maintiennent sensiblement égales à ce qu'elles étaient dans l'œuf : cela explique la survie du nauplius dans une solution de Cl Na.

Ainsi, la coque est imperméable aux ions.

Les résultats de l'analyse biochimique vont encore le confirmer.

2° Utilisation des réserves vitellines chez l'embryon immergé.

Des lots d'œufs sont immergés dans des solutions salines (eau de mer additionnée de 15 °/oo de Cl Na, Cl Na 58 °/oo, Cl K 74 °/oo, Cl_2 Mg $6H_2O$ 135 °/oo, Cl_2 Ca, OH_2O 73 °/oo) et dans de l'eau distillée, à 25°, pendant un temps suffisant pour assurer un développement important, mais sans éclosion.

Comme tous les œufs ne s'hydratent pas et ne se développent pas à la même vitesse, nous ne pourrons jamais avoir, même au moment théorique de la première éclosion, une composition de l'œuf très proche de celle du nauplius éclos : alors que certains œufs auront déjà presque terminé leur développement, d'autres en seront loin et n'auront pas utilisé leurs réserves vitellines. Les résultats donneront seulement « la direction » de l'utilisation des réserves vitellines.

J'ai utilisé des œufs « légers ».

Résultats.

Glucides totaux et lipides. — Les résultats sont groupés dans le tableau n° IV (chaque nombre est la moyenne de plusieurs mesures) :

On voit très nettement le taux des glucides s'abaisser, sauf dans le cas de l'eau distillée où les œufs ont manqué d'oxygène.

Le taux des lipides paraît inchangé ou très légèrement augmenté ; les œufs qui n'ont pas évolué dans l'eau distillée, ont en effet un taux plus bas, ainsi d'ailleurs que les témoins.

L'azote total, protéique et non protéique. — Le taux d'azote total et le pourcentage d'N protéique et d'N non protéique reste parfaitement inchangé pendant la durée de l'immersion : plusieurs dosages opérés sur des œufs immergés dans de l'eau de mer et dans une solution de Cl K, ont donné invariablement :

N total	7,7 %
N protéique	7,29 %
N non protéique	0,41 %

Tableau IV.

	Temps d'immersion	Eau de mer	Cl K	Cl Na	Cl_2 Mg	Cl_2 Ca	Eau distillée
	0	14 %					
	9 h.	9	8,2	11	12		
GLUCIDES.	16 h.	7,6	7,4	7,3 à 8	7,7 à 8,2	7,3 à 9	14,4
	22 h.	7	6				13 à 14,5
	30 h.						13,5 à 14,5
	9 h. 30	17,5	18,2	18,4	18,3	17	17,6
LIPIDES...	15 h. 30	20	19,7	17,9		18,4	17,3

Conclusions. — A l'abri de sa coque imperméable, l'œuf immergé dans une solution saline quelconque, poursuit toujours son développement, à la seule condition d'avoir à sa disposition une quantité importante d'oxygène. Il utilise abondamment ses réserves glucidiques, à l'exclusion de ses réserves lipidiques, qui, bien au contraire, paraissent légèrement croître. L'azote total, l'azote protéique et l'azote non protéique restent par contre inchangés.

3° Consommation d'oxygène et quotient respiratoire.

La consommation d'oxygène d'un tissu, ou plus généralement d'un organisme aérobie, est le reflet de son activité métabolique. Son taux peut varier soit avec les conditions extrinsèques d'approvisionnement en oxygène, soit avec les conditions intrinsèques physiologiques, les premières pouvant avoir des répercussions sur les secondes. Outre la consommation d'oxygène, le quotient respiratoire est très utile dans la détermination de la fraction métabolisée, lipidique, glucidique ou protidique.

Chez un organisme tel qu'*Artemia salina*, l'étude de la consommation d'oxygène et du Q. R. peut donner des indications intéressantes sur le métabolisme. Nous les étudierons sur l'œuf durable immergé avant l'éclosion, sur le nauplius à l'éclosion et chez l'adulte dans différentes conditions.

Dans ce chapitre, seul l'œuf sera étudié ; nous déterminerons :

1° L'intensité respiratoire,

2° La constance de la consommation d'O_2 au cours du développement et de l'éclosion,

3° Le Q. R.

Il est très difficile de savoir si la consommation subit des fluctuations au cours du développement. En effet, tous les œufs ne se développent pas en même temps ; leur consommation d'oxygène ne devient perceptible qu'après hydratation complète de l'œuf ; or, cette hydratation n'est pas rigoureusement semblable pour tous les œufs. Les résultats ont une valeur statistique qui ne permet pas une étude très fine des variations.

Techniques.

Deux techniques ont été utilisées : la méthode de Nicloux, de dosage de l'oxygène dissous dans l'eau, et la méthode manométrique de Warburg. Nous avons surtout utilisé cette dernière qui avait l'avantage de permettre la mesure concomittante du Q. R. Mais l'utilisation des deux méthodes permet de les vérifier et de les compléter l'une l'autre.

Technique de Nicloux.

Principe de la mesure de la consommation d'O_2. — La technique de Nicloux dose l'O_2 dissous dans l'eau. Donc, si on immerge un organisme (petit animal, œuf, etc.) dans un volume d'eau connu, contenu dans un récipient hermétiquement bouché, pendant un temps connu, on peut déterminer sa consommation d'O_2 en dosant l'O_2 dissous dans l'eau avant et après immersion de l'organisme.

Principe de la technique de dosage (81). — L'eau à analyser est rendue alcaline par une solution de potasse contenant un peu d'IK. On ajoute un sel manganeux (chlorure ou sulfate) ; on précipite ainsi l'hydrate manganeux $Mn(OH)_3$:

$$2\ Mn\ Cl_2 + 4\ KOH = 4\ Cl\,K + 2\ Mn(OH)_2$$

Une partie de $Mn(OH)_2$ au contact de l'O_2 donne de l'hydrate manganique $Mn(OH)_3$.

On acidifie le milieu. $Mn(OH)_3$ se comporte comme un oxydant pour IK. L'I_2 est libéré en même temps que $Mn(OH)_2$ est régénéré en donnant le sel correspondant à l'acide employé.

$$2\ Mn(OH)_3 + 2\ IK + 6\ H\,Cl = 2\ Mn\,Cl_2 + 2\,K\,Cl + 6\,H_2\,O + I_2$$

On dosera l'iode libéré.

Le $Mn(OH)_3$ joue donc le rôle de vecteur pour l'oxygène : grâce à lui, l'oxygène de l'eau oxyde l'IK en libérant I_2 pour chaque atome de gaz, (127 g d'I_2 correspondant à 8 g d'O_2).

Pour les détails de la technique, consulter la référence.

Application aux œufs d'Artemia. — Un poids quelconque d'œufs (de 1 à 2 g) est placé dans de l'eau de mer chauffée à 28-30° de façon à peu près constante par une résistance ou une lampe.

Les œufs sont laissés ainsi pendant le temps d'immersion désiré.

Au moment voulu, préparer une série de flacons de volume exactement déterminé par pesée et pouvant se fermer hermétiquement. Ils sont remplis complètement d'eau de mer et immergés dans un B. M. à 30° pendant un temps suffisant pour que l'eau qu'ils contiennent soit à cette température. Prélever 5 cm³ de cette eau sur laquelle on fait le dosage de l'oxygène d'après la méthode Nicloux (le prélèvement doit être fait avec beaucoup de soin, de préférence sous huile de paraffine) : l'eau est placée dans un petit tube en Y renfermant une bille de verre, du modèle décrit par Nicloux dans sa technique.

Prélever alors, à l'aide d'une pipette, un volume d'eau de mer de 5 cm³ contenant un certain nombre d'œufs d'*Artemia* (100 à 200 mg). Les placer dans le flacon qui se trouve ainsi complètement rempli et est alors hermétiquement bouché. Le laisser au B. M. à 30° pendant un temps déterminé (1/2 h. ou 1 h.). Au bout de ce temps, prélever 5 cm³ sur lesquels on fait le dosage de l'O_2.

Le contenu du flacon est filtré avec soin : les œufs qui s'y trouvent, recueillis d'une façon rigoureusement quantitative, sont lavés, séchés, puis pesés.

Connaissant : le volume exact de l'eau contenue dans le flacon,
le taux d'oxygène dissous primitivement dans l'eau,
le taux d'oxygène dissous dans l'eau à la fin de l'expérience,
le poids sec des œufs immergés,
le temps de l'immersion,

il est facile de calculer la consommation d'O_2 en mm³ par heure, pour 100 mg d'œufs (poids sec).

N. B. — Pendant le temps de l'expérience, il faut agiter le flacon à intervalles réguliers et assez souvent afin d'homogénéiser la répartition des œufs. En effet, ceux-ci ont l'inconvénient de se rassembler à la partie supérieure en un amas qui nuirait à la régularité de la consommation d'oxygène.

Des témoins ont été faits avec des poids analogues d'œufs préalablement tués par passage à l'étuve à 100°.

Aucune diminution de l'oxygène n'a été décelée.

Avantages et inconvénients de la méthode de Nicloux. — Elle a été très utilisée pour l'étude de la consommation d'oxygène des organismes aquatiques ; elle a l'avantage de pouvoir être utilisée pour des animaux

de grande taille pour lesquels il est impossible d'utiliser la méthode de Warburg.

Elle est parfaitement applicable à de petits organismes tels que les œufs d'*Artemia salina*, à condition que ceux-ci soient en quantité suffisante.

Elle ne permet pas de mesurer le quotient respiratoire.

Technique de Warburg.

Pour le principe bien connu de la méthode, ainsi que pour les détails usuels de technique (calibration de l'ensemble flacon-manomètre, utilisation du thermo-baromètre, lecture de résultats) et des calculs (calcul du volume du flacon, des coefficients kO_2 et kCO_2 ; calcul du Q. R.), consulter les ouvrages suivants : Umbreit, Burris, Stauffer (97), Dixon (22).

Nous avons opéré à 30°, comme dans la méthode de Nicloux, en milieu d'eau de mer non bicarbonatée pour éviter tout effet tampon avec absorption ou dégagement de CO_2.

Les œufs à étudier sont placés en quantité quelconque comme précédemment, dans de l'eau de mer sursalée, non bicarbonatée, pendant le temps désiré, à la température de 28 à 30°.

Au moment voulu, on prélève 5 cm^3 de cette eau contenant de 15 à 40 mg d'œufs. Ces 5 cm^3 sont placés dans un flacon de Warburg. Nous avons utilisé des flacons d'un volume de 15 cm^3 environ. La quantité de KOH à 30 % utilisée est de 0,2 cm^3.

Pour la mesure du Q. R., au lieu d'utiliser deux échantillons semblables, mais séparés, j'ai opéré sur le même échantillon de la façon suivante :

Dans un premier temps, je mesure les dénivellations manométriques dues à l'absorption du O_2 et au dégagement du CO_2 dans un flacon ne renfermant pas de KOH. Puis, sur le même échantillon, j'ajoute les 0,2 cm^3 de KOH 30 % et je mesure la consommation de O_2 après une période de stabilisation de 30 minutes. Cela présente le désavantage de faire porter les mesures sur un temps assez long (il faut compter environ 3 heures à 3 h. 30 pour une série de mesures), mais à l'avantage d'opérer les deux mesures (avec KOH et sans KOH) sur le même échantillon.

Les mesures terminées, les œufs sont récupérés par filtration, lavés, séchés et pesés.

Résultats.

Consommation d'O_2. — L'ensemble des résultats donnés par les méthodes de Warburg et de Nicloux, en fonction du temps d'immersion, sont donnés dans le tableau nº V.

Quotient respiratoire. — 32 mesures donnent une moyenne de 1,02.

Conclusions.

Consommation d'oxygène. — Nous voyons qu'après une première période d'accroissement de l'intensité respiratoire, qui correspond à l'hydratation successive des œufs et qui dure environ 4 heures, la consommation d'oxygène se stabilise vers 200-220 mm³/heure pour 100 mg poids sec. Les variations observées ne peuvent être interprétées comme des fluctuations réelles de la respiration, car les méthodes employées n'ont pas la sensibilité suffisante. Au moment de l'éclosion et avant la nage, je n'ai pas observé de variations significatives. On noterait plutôt une légère diminution (180 à 190 mm³).

Quotient respiratoire. — Le Q. R. est égal ou légèrement supérieur à l'unité. Ceci indique très nettement une utilisation exclusivement *glucidique*, peut-être même, une destruction incomplète des glucides avec synthèse et accumulation des lipides. Nous avons vu que les résultats de l'analyse chimique de l'embryon en cours d'immersion et après l'éclosion, étaient en accord avec ces données.

C. — **Le nauplius à l'éclosion.**

La larve qui sort de la coque et des enveloppes de l'œuf est au stade nauplius et non au stade métanauplius, comme cela a été longtemps admis (Barigozzi, 3).

Table

mm³ d'O_2/h. p. 100 mg poids sec.	Temps d'immersion	1 h. 15	2 h.	2 h. 30	3 h.	3 h. 30	4 h.
	Warburg (100 mesures)	100	90	160	180	120	220
	Nicloux (42 mesures)	47	154	110			

Ce nauplius, de couleur jaune orangé, est de très petite taille et piriforme ; il présente les caractères morphologiques de ce stade (corps non segmenté, trois paires d'appendices) ; l'œil médian qui apparaît seulement au moment de l'éclosion s'accentue dans les quelques heures qui suivent.

Sa transformation en métanauplius est rapide, ce qui explique les erreurs des premières observations. Barigozzi a dressé la liste chronologique de différents stades de l'éclosion à l'âge adulte.

Obtention et récolte. — Une grande quantité d'œufs (2 à 3 grammes) sont mis à éclore dans un cristallisoir contenant 4 à 5 litres d'eau de mer. Une lampe chauffe l'eau vers 25 à 30°. Très photosensibles, les nauplius se groupent dans la partie du cristallisoir la mieux éclairée. On les aspire à l'aide d'une pipette au fur et à mesure de l'éclosion. Sensibles à l'asphyxie ils succombent vite s'ils sont groupés en trop grand nombre. Il faut les recueillir dès que possible.

Ils sont filtrés sur papier et lavés très rapidement à trois reprises avec de l'eau distillée. Suivant leur utilisation ultérieure, ils peuvent être soit stockés dans l'alcool (en vue de toutes les analyses de lipides, glucides, N total et protéique, etc.), soit servir directement à la détermination de leur teneur en eau et à leur numération en vue du calcul de leur poids.

1° Pesée et teneur en eau.

Pesée. — Afin de pouvoir comparer les poids de l'embryon contenu dans l'œuf et du nauplius à l'éclosion, il fallait, après avoir déterminé le poids de l'embryon, déterminer celui du nauplius.

Technique. — Il est beaucoup plus difficile et délicat de déterminer le poids du nauplius que celui de l'œuf durable. Le nauplius est très fragile : desséché dans un récipient, il devient transparent et presque

V.

5 h.	5 h. 30	6 h.	6 h. 30	8 h.	8 h. 30	14 h.	15 h.	20 h.
240	230	220	230	200	230	200	250	210
	150			200			200	210

invisible. Aussi, au moment de la numération les nauplius ne doivent pas être secs. D'autre part, ils doivent être fixés sur le support (boîte de Pétri par exemple) et facilement transvasables. J'ai opéré de la façon suivante :

Une très petite quantité de nauplius est immergée dans un peu d'alcool et placée dans une petite boîte de Pétri. L'alcool est évaporé légèrement de façon à ce que les nauplius ne puissent plus être déplacés sur le fond de la boîte par des courants liquides, sans toutefois être desséchés. Ils sont alors très visibles. Pour la numération, il suffit de placer la boîte de Pétri dans laquelle sont fixés les nauplius, sur un fond noir quadrillé et de les compter à l'aide d'une loupe binoculaire à grand champ en s'aidant du quadrillage. Lorsque la numération est terminée, on ajoute de l'alcool et tous les nauplius sont transvasés quantitativement dans un récipient taré. On groupe ainsi plusieurs lots de numération de façon à obtenir un poids sec total final de 30 à 50 mg.

Voici le détail des résultats :

Tableau VI.

Poids sec des lots en mg	Nombre de nauplius	Poids sec du nauplius en gammas
44	11.869	2,95
34	11.536	2,94
30,5	10.770	2,80
53,5	18.860	2,80
35	12.000	2,9
197,0	68.560	2,87 γ

Ces mesures ont été faites sur des nauplius issus d'œufs lourds. Donc, l'embryon qui pesait 2,7 γ dans l'œuf durable, en pèse 2,87 au moment de l'éclosion.

Teneur en eau. — Un lot important de nauplius (1 à 2 g), est lavé sur filtre avec de l'eau distillée puis recueilli en dernier lieu sur un creuset de Gooch ou de Büchner. Ils sont étendus en une mince couche régulière sur un papier filtre : on fait le vide ; toute l'eau extérieure au corps de l'animal est aspirée.

A l'aide d'une spatule on recueille un certain poids, p ; après dessiccation à l'étuve sous vide jusqu'à poids constant, on pèse le résidu sec.

14 mesures donnent une teneur en eau de 75 % :

Résidu solide	2,9 γ (25 %)
Eau	8,7 γ (75 %)
Poids du nauplius hydraté	11,6 γ (100 %)

2° Composition chimique.

Introduction. — Les animaux ont été recueillis le plus possible à l'éclosion ; mais peut-être un certain nombre d'entre eux étaient-ils plus âgés de quelques heures et les résultats ne donnent pas avec une exactitude absolue la composition de l'embryon au moment de l'éclosion.

Les nauplius ont éclos dans de l'eau de mer utilisée couramment dans les élevages (eau de mer + 15 ‰ de Cl Na).

Lipides et caroténoïdes. — Comme dans le cas des œufs, l'extraction par l'alcool fractionne les constituants du nauplius en trois parties : le résidu protéique, l'extractif soluble dans l'eau et les lipides solubles dans le C^6H^6.

Voici les résultats présentés dans le tableau VII :

Tableau VII.

Poids sec total en mg	Extrait alcool. total		Résidu		Extractif hydrosoluble		Lipides	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
4.308	1.933	*45*	2.375	*55*	1.016	*21,5*	889	*23,5*

Chez le nauplius, les fractions mentionnées se répartissent donc ainsi :

Résidu	55 %
Extractif hydrosoluble	21,5 %
Lipides	23,5 %

Dans d'autres lots, peut-être recueillis très exactement dans les premières heures suivant l'éclosion, le taux des lipides atteint 25 %.

Acides gras et insaponifiable. — Les lipides des nauplius contiennent :

Insaponifiable	12 %
Acide gras	64 %

Caroténoïdes. — Un lot de nauplius lavés est desséché à l'étuve sous vide en présence de P_2O_5, à 30°. Le résidu très sec est épuisé par un solvant approprié. Après filtration, la solution colorée est examinée au spectrophotomètre.

Le spectre dans la pyridine, l'éther de pétrole, l'alcool et le $CHCl_3$, présente exactement le même aspect que celui de l'œuf durable. La chromatographie sur colonne d'alumine ne montre également que de l'*astacène*. Le nauplius conserve donc, sans modification, le caroténoïde présent dans l'embryon.

Les glucides.

Les glucides totaux. — On peut opérer soit sur un poids connu de nauplius desséchés à l'étuve, soit sur le résidu d'évaporation des lots de nauplius conservés dans l'alcool. Le matériel, dans les deux cas, est broyé en présence de sable, puis mis en suspension, dans HCl 2N. On hydrolyse pendant trois heures et on opère comme de coutume.

Dix dosage ont donné une moyenne de 6 % de glucides totaux.

Le glycogène. — Il est dosé soit directement sur les nauplius totaux desséchés, soit sur le résidu d'extraction des lipides.

Sur les nauplius totaux secs, six mesures ont donné une moyenne de 5,3 % de glycogène.

Sur le résidu, sept mesures donnent une moyenne de 12 %. Le résidu constituant environ 55 % du poids total, la teneur en glycogène serait donc de 6,6 %. Sans doute y a-t-il une erreur par excès.

D'après ces résultats, les glucides du nauplius à l'éclosion seraient constitués à peu près uniquement par du glycogène. J'ai cependant jugé bon de rechercher le tréhalose.

Le tréhalose. — L'extractif alcoolique à froid des nauplius, après évaporation, est repris par de l'eau distillée. Cette solution ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais, après hydrolyse, elle devient légèrement réductrice ; cela indique bien la présence de tréhalose.

L'extractif hydrosoluble ne renferme que 3 % environ de glucides réducteurs, ce qui représente seulement 0,6 % des glucides totaux. *Ce corps est donc beaucoup moins abondant dans le nauplius qu'il ne l'était initialement dans l'œuf.*

L'azote total, l'azote protéique et l'azote non protéique.

Comme dans l'œuf, l'N est dosé par la méthode de KJEHDAL sur le matériel total, puis sur le résidu de l'extraction alcoolique ; par calcul, on déduit le taux d'N non protéique.

Une première série de mesures a été faite sur des nauplius éclos dans l'eau de mer additionnée de 15 ‰ de Cl Na.

Mais comme il m'a paru intéressant de voir les variations éventuelles du taux d'N non protéique en fonction de la salinité, des séries de mesures de lipides, résidu et extractif ont été refaites sur des nauplius éclos dans des eaux de salinités différentes. Malheureusement, cette étude est limitée par l'impossibilité de faire éclore des œufs dans des salinités élevées.

Ont été utilisées :

1° de l'eau de mer pure,
2° de l'eau de mer additionnée de 25 ‰ de Cl Na,
3° de l'eau de mer additionnée de 35 ‰ de Cl Na.

Les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII.

	% Résidu	% Lipides	% N total	% N. prot.	% N non prot.	% d'N non prot. p. rap. N total
Eau de mer pure....	56,4	25,2	8,1	6,8	1,3	*16*
Eau de mer + 25 ‰.	53,8	25,2	7,9	6,6	1,3	*16,4*
Eau de mer + 35 ‰.	51	25	7,8	6,3	1,5	*19,2*

On constate :

1° Que le taux des lipides est élevé, atteignant 25 % ;

2° Que l'azote total paraît diminuer avec la salinité,

3° Que l'azote protéique diminue légèrement et l'azote non protéique augmente.

Bien que l'amplitude de ces variations soit faible, elles paraissent cependant être de même sens.

Chromatographie des amino-acides.

Amino-acides libres. — Le taux d'N non protéique s'élève considérablement dans le nauplius au moment de l'éclosion, passant de 7 % de l'azote total chez l'œuf, à 16 % de l'azote total chez le nauplius. Aussi, il m'a paru intéressant de comparer les amino-acides libres chez l'embryon en anhydrobiose et chez le nauplius.

Un poids assez important de nauplius frais est séché en présence d'alcool (pour fixer les protéines) à l'étuve sous vide. Le résidu pulvérisé est extrait à l'acétone chlorhydrique pendant 5 à 6 heures. L'extrait acétonique est filtré puis évaporé. Après extraction par l'éther de pétrole (élimination des lipides), le résidu est repris par une petite quantité d'eau distillée. L'extrait est prêt pour la chromatographie.

Par ordre d'importance, on retrouve : alanine, glycocolle + sérine ; proline ; tyrosine, acide glutamique ; valine, arginine, thréonine ; phénylalanine, leucine ; acide aspartique.

Amino-acides totaux après hydrolyse des protéines. — Après hydrolyse et extraction d'après la méthode déjà exposée au sujet des œufs, on trouve les amino-acides suivants : acide aspartique ; glycocolle + sérine ; acide glutamique ; proline, valine, phénylalanine, leucine ; alanine, tyrosine, arginine, lysine ; thréonine.

Si on compare ces résultats à ceux obtenus dans les mêmes conditions chez l'œuf durable, on voit que les variations sont les plus significatives dans le cas des amino-acides libres. On observe une augmentation du taux de la proline (principalement), de l'alanine, du glycocolle, de l'arginine et de la thréonine. Par contre, les acides glutamique et surtout aspartique ont leur taux abaissé, au moins relativement aux précédents.

Les sels minéraux.

Le phosphore total. — Dosé par la méthode Machebœuf-Delsal, son taux est de 1 %.

Chlorures. — Sur les nauplius secs et pulvérisés, on dose le chlore par les méthodes utilisées chez les œufs.

Dans une eau de mer additionnée de 15 ‰ de Cl Na, le nauplius contient 1,33 % de Cl. Dans de l'eau de mer pure, il n'en contient qu'un peu moins : 1,26 %.

Il est évident qu'il y a ici une certaine erreur par excès provenant de la présence d'eau de mer dans le tube digestif de l'animal ; mais elle ne peut être importante et enlever toute signification aux résultats.

3° La consommation d'oxygène et quotient respiratoire.

Comme dans le cas des œufs, les méthodes de Nicloux et Warburg ont été utilisées. Les détails de techniques sont exactement les mêmes.

Résultats.

La méthode de Nicloux. — 21 mesures donnent une moyenne de 1740 $mm^3/h/100$ mg sec.

La méthode de Warburg. — Donne des résultats trés inférieurs : 1050 mm^3 (moyenne de 34 mesures).

Je pense que cette différence provient de l'espace beaucoup plus grand dont les nauplius disposent dans les conditions d'expérience de la méthode de Nicloux.

Quotient respiratoire. — 39 mesures donnent une moyenne de 0,71. Cette valeur très basse indique une nette utilisation de lipides.

4° Résumé de la composition du Nauplius.

Ce nauplius a éclos dans une eau de mer additionnée de 15 °/oo de Cl Na.

Poids sec	2,87
Pourcentage d'eau dans le poids frais	75 %
Glucides totaux	6 % dont : 5,4 de glycogène et 0,6 de tréhalose (env.)
Lipides totaux	23 à 24 % dont 64 % d'acides gras et 12 % d'insaponifiable.
Azote total	7,9 % dont : 6,6 % d'N protéique et 1,3 % d'N non protéique (celui-ci représentant 16 % de l'N total).
Phosphore total	1 %
Cl	1,33 %

La consommation d'oxygène est intense, supérieure à 1.000 mm^3/heure/100 mg poids sec, donc cinq fois plus grande que celle des embryons immobiles en développement et le quotient respiratoire est très bas.

D. — Conclusions générales sur le métabolisme de l'embryon.

Le poids sec reste à peu près inchangé : il passe de 2,7 chez l'embryon à 2,87 chez le nauplius. Si l'on considère qu'il y a une légère absorption saline au moment de l'éclosion (le taux de Cl^- passe de 0,31 chez l'embryon à 1,33 % chez le nauplius) et que, d'autre part le Q. R. de l'embryon, égal à l'unité, indique un équilibre entre absorption d'O^2 et rejet de CO^2, ce résultat n'est pas étonnant.

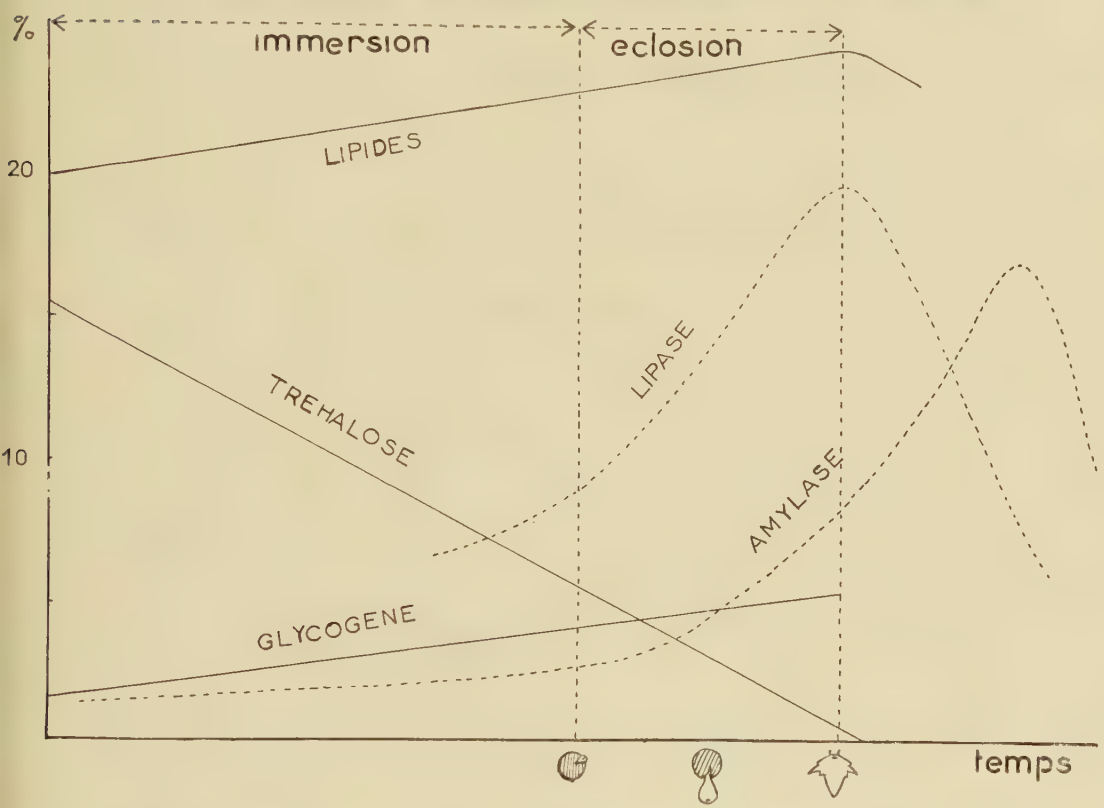
Les glucides constituent la principale réserve utilisée par l'embryon ; le tréhalose qui représente la plus grande partie de cette réserve est pratiquement utilisé en totalité entre l'anhydrobiose et l'éclosion : son taux passe en effet de 15,3 % à 0,6 % environ. Le glycogène, par contre, n'est pas utilisé ; bien au contraire, il parait synthétisé, sans doute à partir du tréhalose, car son taux passe de 1,5 à 5 % environ.

Les lipides dont l'embryon est riche (20 %) ne sont pas utilisés : ils sont au contraire synthétisés pendant l'immersion, car à l'éclosion, leur taux peut atteindre 24 à 25 % chez le nauplius. Le Q. R. élevé de l'embryon en immersion, parait indiquer que cette synthèse de lipides se fait à partir du tréhalose. Une telle synthèse lipidique à partir d'un glucide se rencontre fréquemment chez les embryons aquatiques ; récemment, Horstmann (58) constate une synthèse de lipides à partir du galactogène chez l'embryon de *Limnaea stagnalis*. Par contre, dès l'éclosion les réserves de tréhalose sont totalement épuisées, ce sont les lipides qui sont utilisés. Le Q. R. s'abaisse en conséquence à 0,7 environ et le taux des lipides baisse juqu'à atteindre 16 à 17 % chez les animaux âgés de 7 à 8 jours. Ce taux de 16 à 17 % est d'ailleurs celui que l'on trouve chez l'adulte.

L'azote total représente chez l'embryon 7,4 % du poids sec, ce qui correspond à 50 % environ de protides.

Ces 7,4 % d'N total contiennent une petite proportion d'N non protéique (0,53 % du poids total, soit 7 % de l'N total). Pendant tout le développement précédant l'éclosion, ces taux restent inchangés. Mais, à l'éclosion, lorsque le nauplius sort de la coque et se trouve en contact avec le milieu extérieur dont il était jusqu'alors séparé par

une épaisse coque, le taux d'N non protéique augmente considérablement et atteint 16 à 17 % de l'N total qui, lui-même, a légèrement augmenté (7,8 %) ; presque tous les amino-acides ont leur taux relevé et tout particulièrement la proline. Ce phénomène peut être dû soit à une modification d'origine intrinsèque, coincidant avec l'organisa-



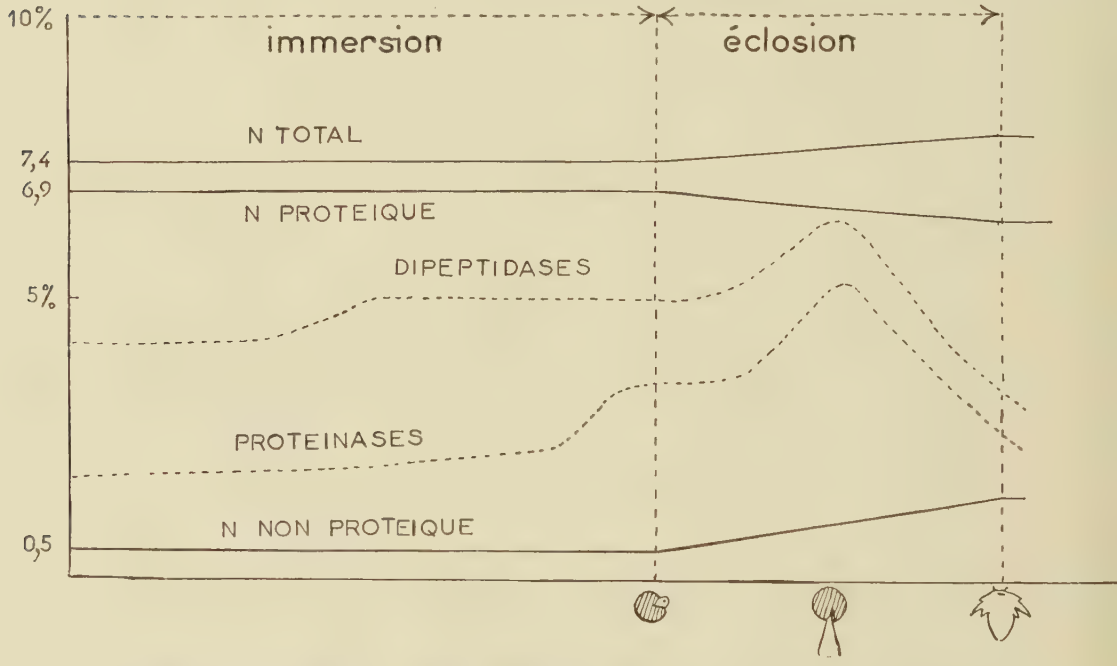
GRAPHIQUE III. — Utilisation des réserves vitellines au moment de l'éclosion : le tréhalose, le glycogène et les lipides. Comparaison avec les courbes d'activités lipasique et amylasique de BELLINI.

tion du nauplius et l'épuisement des réserves vitellines, soit à l'adaptation osmotique de l'organisme à des salinités élevées, analogues à celles que nous rencontrerons chez l'adulte. Il semble que les deux phénomènes interviennent.

La différence existant entre les œufs lourds et les œufs légers peut être expliquée dans une certaine mesure par les faits précédents. Les lourds doivent leur forte densité à une coque plus épaisse. Leur teneur moins élevée en tréhalose (12,5 au lieu de 15,3) mais plus élevée en

glycogène (3,5 au lieu de 1,5) les fait paraître plus évolués que les œufs légers. Par contre, leur faible teneur en lipides est difficilement explicable.

Il est particulièrement intéressant de comparer ces résultats concernant l'utilisation des réserves avec ceux très récents obtenus par l'école d'Urbani dans un travail sur les enzymes chez *Artemia salina* au cours



Graphique IV. — Utilisation des réserves vitellines au moment de l'éclosion : l'N total, l'N protéique et l'N non protéique. Comparaison avec les courbes d'activités dipeptidasique et protéinasique de Bellini.

du développement embryonnaire. D'après Urbani, Rognone, Russo (98) ; Urbani, de Cesaris Coromaldi (99) ; Urbani, Russo, Rognone (100), lipase, amylase, protéinases et peptidases existent dans l'œuf en anhydrobiose, mais restent inactifs tant que l'œuf n'est pas immergé.

Les protéinases et dipeptidases (Bellini, 6) ont leur maximum d'activité au moment de l'éclosion, plus exactement au moment de l'éclatement de la coque, lorsque le nauplius est encore contenu dans la mince enveloppe transparente qu'il conserve quelque temps avant d'en sortir et de nager. Dès que le nauplius nage, leur taux décroît lentement.

L'activité lipasique (Bellini, Lavizzari, 8) se situe un peu plus tard, lorsque le nauplius commence à nager : elle décroît d'ailleurs rapidement.

L'activité amylasique (Bellini, 7) ne se situe que beaucoup plus tard (55 heures environ après l'éclosion).

Pendant l'immersion, seules les dipeptidases ont une augmentation d'activité appréciable dès l'immersion, les protéinases n'atteignent à une certaine activité que peu de temps avant l'éclosion. La lipase et l'amylase n'en présentent qu'après l'éclosion. De plus, Urbani, Bellini (102) constatent une élévation de l'activité ribonucléasique au moment de l'éclosion coïncidant avec une chute des acides ribonucléiques au moment de la sortie de la coque ; leur taux remonte chez le nauplius commençant à nager.

Il sera indispensable d'ajouter à cette liste la recherche de l'activité tréhalasique pendant l'immersion.

La chute brutale des activités enzymatiques, venant d'ailleurs après une période d'accroissement, indique, pour Bellini, l'épuisement des réserves vitellines. Ce phénomène se retrouve chez les Amphibiens (travaux de Cotronei et d'Urbani, (100)) et signe le passage de la vie embryonnaire à la vie larvaire. En comparant ces résultats avec ceux obtenus dans ce travail, il semble en effet que l'augmentation de l'activité de l'enzyme coïncide, soit avec l'utilisation et l'épuisement des réserves vitellines auxquelles il correspond (cas des lipides et probablement du tréhalose), soit avec la mobilisation des constituants protidiques.

L'ensemble des résultats est présenté dans les graphiques n^{os} III et IV.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LES VARIATIONS DU MÉTABOLISME ET DU MODE DE REPRODUCTION DE L'ADULTE EN FONCTION DE LA SALINITÉ

L'adaptation des *Artemia* adultes à des milieux de salinité extraordinairement élevée étant la caractéristique la plus remarquable de cet animal, nombreux sont les travaux consacrés à l'étude de la pénétration, toxicité et antagonisme des ions (Baas Becking, Karsten, Kanner ; Martin, Wilbur ; Prosser ; Sparrow ; Warren, Kuenen, Baas Becking), de la pression osmotique et de sa régulation (Medwedewa ; Plattner ; Groghan).

Rattachés à l'étude de l'influence de l'augmentation de la salinité du milieu extérieur, on trouve un certain nombre de travaux sur la consommation d'oxygène et sur la présence et la synthèse de l'hémoglobine.

Cependant, il ne semble pas qu'il faille relier à l'action de la salinité toutes les conséquences qu'on lui attribue d'ordinaire.

En effet, l'augmentation de la concentration saline du milieu extérieur peut agir de diverses façons et, en particulier, à plusieurs niveaux du métabolisme animal.

1° *Action directe :* C'est l'augmentation de la concentration du milieu intérieur ; elle est extrêmement importante par suite des équilibres nouveaux qu'elle impose à l'organisme.

2° *Action indirecte :* Elle agit en diminuant l'approvisionnement des tissus en oxygène et cela à deux niveaux :

a) En diminuant l'approvisionnement à *l'échelon de l'individu* : la solubilité de l'oxygène diminue dans les solutions concentrées et l'accroissement de la salinité agit dans le même sens que l'accroissement de la température ;

b) En diminuant l'approvisionnement *à l'échelon des tissus* : plus le milieu est concentré, plus il est visqueux et plus l'animal doit dépenser

d'énergie musculaire pour nager. En outre, le maintien de l'équilibre osmotique utilise également une certaine quantité d'oxygène. Le besoin d'oxygène s'accroît donc en même temps que l'apport décroît.

Dans ce travail, je me suis surtout attachée à l'étude :

1° des modifications biochimiques éventuelles provoquées par l'augmentation de la concentration ionique du milieu intérieur, conséquence déjà démontrée (Medwedewa (76), Warren, Kuenen, Baas Becking (106) et Kuenen (64)), de l'augmentation de la salinité du milieu extérieur ;

2° de la présence et de l'origine des pigments caroténoïdes et hémoglobiniques dont les rôles me paraissent de première importance ;

3° des conditions de l'apparition de l'oviparité et de la viviparité chez la femelle, question à laquelle aucun auteur ne s'était intéressé par suite des apparentes difficultés de leur étude ;

4° de la consommation d'oxygène en fonction de plusieurs facteurs, les résultats étant particulièrement discordants à ce sujet.

Chapitre IV.

LA COMPOSITION DE L'ORGANISME EN FONCTION DES VARIATIONS DE LA SALINITÉ

A. — Les constitutants principaux.

L'analyse des principaux constituants telle qu'elle a été pratiquée pour l'œuf et le nauplius, va-t-elle apporter dans le cas de l'adulte des renseignements aussi précieux ? Nous pouvons prévoir déjà qu'ils ne seront pas du même ordre. Dans le cas de l'embryon, nous étudions l'utilisation des réserves vitellines, mais dans le cas de l'adulte, les substances de réserve dépendent étroitement de la nourriture ; aussi, les résultats des dosages de glucides et de lipides en particulier, n'auront jamais qu'une valeur indicative : leurs fluctuations seront nécessaire-

ment très grandes. Le taux de l'azote protidique et non protidique s'avèrera beaucoup plus stable et donnera des résultats intéressants sur l'adaptation osmotique.

Les analyses sont faites exclusivement sur les mâles, la présence des œufs chez les femelles étant une cause d'erreurs.

Chez l'adulte se présente une difficulté technique inexistante chez le nauplius : c'est la présence du tube digestif et de son contenu qui peuvent être une importante cause d'erreurs dans les dosages. En effet, pour s'en convaincre, il suffit d'observer un animal vivant dans une culture d'algues ; au milieu d'un corps presque incolore se détache un volumineux tube digestif bourré d'algues. L'ablation chirurgicale telle qu'elle a été appliquée pour la caractérisation des caroténoïdes (cf. p. 93) n'est pas possible pour une analyse totale, les pertes en hémolymphe et surtout en tissus divers étant trop grandes ; de plus, elle nécessiterait un travail trop long. Aussi, le jeûne nous a paru préférable ; cependant, il n'est pas absolument satisfaisant ; en effet, l'élimination du contenu digestif est très lente ; il faut compter plusieurs jours ; l'animal est alors en mauvais état comme si le jeûne était déjà trop long. En pratique, j'ai utilisé des animaux ayant vécu pendant trois jours dans de l'eau de mer limpide, dépourvue de nourriture.

Poids frais et poids sec. — Les mâles vivant dans une eau de mer additionnée de 15 ‰ de Cl Na renferment en moyenne 90 % d'eau, soit 10 % de substance sèche.

Les lipides.

Technique. — Les animaux sont lavés à l'eau distillée, puis placés dans de l'alcool ; ils peuvent alors être stockés. Ils sont ensuite broyés ou coupés en fines particules avant d'être placés dans la nacelle en papier d'un micro-Kumagawa.

Résultats. — L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau IX : les analyses ont été faites sur une dizaine de lots pour chaque salinité. Les résidus serviront ultérieurement à la détermination de l'N protéique.

Le taux des lipides est élevé : 16 à 17 % environ. Remarquons que l'extractif alcoolique hydrosoluble augmente considérablement avec la salinité.

Tableau IX.

	Poids sec total en mg	Résidu		Extrait alcool. total		Extractif hydrosoluble		Lipides	
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Mâles dans 53 ‰ en Cl Na	1.169,5	785,5	*67,2*	384,1	*32,8*	182	*14,7*	202	*18,1*
Mâles dans 122 ‰ en Cl Na	674,5	381,5	*56,6*	293	*43,4*	182,5	*27,4*	110,5	*16*
Femelles dans 186 ‰ en Cl Na [1]	978	523	*53,4*	455	*46,6*	260	*27,6*	195,5	*19*
Femelles dans 227 ‰ en Cl Na [1]	825	444,5	*53,8*	380	*46,2*	254,5	*30,8*	125,5	*15,2*

1. Femelles parthénogénétiques recueillies dans les marais salants de la région de Sète.

Les glucides.

Les glucides totaux. — Un lot conservé dans l'alcool est desséché à poids constant, puis pulvérisé. Le dosage est fait, après hydrolyse, par la méthode de Folin-Wu. Nous ne disposions pas de suffisamment de matériel pour faire un dosage par la méthode de G. Bertrand.

Résultats. — Les glucides totaux, chez un animal nourri, s'élèvent à 9,6 % et chez un animal à jeun dans les conditions de l'expérience à 8 %. Mais de tels résultats ne donnent qu'un ordre de grandeur, les résultats étant très variables d'un lot à l'autre.

Le glycogène. — En fait, j'ai dosé les glucides totaux dans les résidus d'extraction.

Chez l'animal nourri, je trouve une teneur en glucides de 13,2 % dans le résidu. Si l'on considère que celui-ci représente les 56,6 % du poids total de l'animal, celui-ci contiendrait 8,9 % de glucides insolubles dans l'alcool.

Les glucides de l'adulte sont donc en majeure partie constitués par du glycogène ou des glycoprotéines.

Tréhalose. — L'extractif alcoolique d'un lot d'adultes, réduit légèrement la liqueur de FEHLING après hydrolyse. Sans doute, le tréhalose existe chez l'adulte comme chez le nauplius en très petites quantités.

Les variations de salinité ne paraissent guère influencer les taux de lipides et de glucides.

L'azote total, l'azote protéique et non protéique. — Comme dans le cas des œufs et des nauplius, l'N total est déterminé directement sur un lot d'adultes desséchés, alors que l'azote protéique est mesuré sur le résidu d'extraction des lipides.

Les résultats sont présentés dans le tableau n° X :

Tableau X.

	% Résidu	% N dans le résidu	% N total	% N prot.	% N non prot.	% d'N non prot. p. rap. N total
Mâles dans 53 °/₀₀ en Cl Na	66	10,4	8,3	6,86	1,44	*17,3*
Mâles dans 122 °/₀₀ en Cl Na	56,6	10,7	9,3	6,05	3,3	*35,4*
Femelles dans 227 °/₀₀ en Cl Na	53	11,1	8,5	5,88	2,62	*30*

La fraction de l'N non protéique augmente considérablement avec la salinité. Alors que chez l'adulte vivant dans une eau de mer peu enrichie en Cl Na (53 °/₀₀ en Cl Na), l'N non protéique ne représente que 17 % de l'N total, chez l'animal vivant dans une eau très sursalée (120 °/₀₀ en Cl Na), cette proportion atteint 35 %.

Chez les femelles de Sète, vivant dans une salinité de 200 °/₀₀ environ, ce pourcentage n'est que de 30 %. Il est possible qu'après une période de défense intense contre l'augmentation de salinité, se traduisant par une élévation considérable de l'N non protéique, ce pourcentage se stabilise par la suite à un taux légèrement inférieur. Peut-être aussi, les œufs sont-ils seuls cause de cette différence.

En tout cas, il est hors de doute que l'N non protéique augmente considérablement avec la salinité. Sans doute, ce phénomène est-il en relation directe avec l'augmentation de la concentration ionique du milieu intérieur. Ce phénomène paraît bien dépendre de l'élévation

de la concentration saline et non pas de la diminution de la concentration en oxygène, comme dans le cas de la synthèse de l'hémoglobine, car il a été observé chez les adultes très riches en hémoglobine provenant d'une eau pauvre en oxygène.

Les amino-acides libres. — L'étude chromatographique montre, quelle que soit la concentration du milieu ambiant, la présence dans l'animal total (tissus et hémolymphe) d'un certain nombre d'amino-acides libres : glycocolle, sérine, alanine, arginine, proline, valine, phénylalanine, leucine, acides aspartique et glutamique. L'accroissement de salinité du milieu provoque plutôt un accroissement de la concentration de ces amino-acides libres que la libération d'autres amino-acides à partir des protéines. Les variations observées ne peuvent être considérées comme quantitativement significatives ; il semble cependant qu'à une augmentation de salinité du milieu extérieur, corresponde une augmentation du groupe glycocolle-sérine, et une diminution, sinon absolue, du moins relative, de l'alanine.

Les sels minéraux. Le Cl⁻. — Il n'a pu être dosé que sur l'animal total, d'où une cause d'erreur importante provenant de l'eau de mer renfermée dans le tube digestif.

Les résultats sont donnés dans le tableau XI :

Tableau XI.

Cl^- ‰ dans le milieu ...	32	74	113	138
Cl^- ‰ d'animaux secs ..	34 à 39	47 à 50	54	55

Le taux de Cl^+ du milieu intérieur s'accroît avec celui du milieu extérieur, mais dans des proportions beaucoup plus faibles. L'isoosmoticité paraît se situer vers 35 ‰ de Cl^+.

B. — Les pigments.

Nous savons qu'au siècle dernier, les auteurs ont attribué la couleur rougeâtre des marais salants à la pullulation des *Artemia*. Si, par la suite, cette hypothèse s'est avérée fausse, elle nous indique que la couleur rouge d'*Artemia* est très remarquable.

Personnellement, j'ai observé les *Artemia* dans les salines de Sète pendant le mois d'août : deux populations très différentes d'aspect attiraient l'attention.

L'une, vivant dans une salinité de 186 °/₀₀ en Cl Na, était représentée par des femelles de belle taille à la poche ovigère gonflée d'œufs durables : leur couleur, loin d'être franchement rouge, était brune, tirant plus ou moins sur le rouge ou le vert. Elles présentaient en outre des dépôts de caroténoïdes sur leurs appendices natatoires.

Une seconde population beaucoup plus réduite vivant dans une salinité beaucoup plus élevé (226 °/₀₀ en Cl Na) était composé d'individus de petite taille, à l'abdomen très allongé et dont la poche ovigère ne contenait que de très rares œufs. Ces animaux paraissaient être à la limite de leur possibilité d'adaptation. Ils étaient d'un rouge orangé très vif ; leur tégument très riche en caroténoïdes leur donnait une teinte orangée et leur hémolymphe était rouge sang.

Dans les élevages, il est beaucoup plus aisé d'observer de très grandes variations de couleur. Voici les différentes teintes observées en fonction du milieu d'élevage. Nous verrons plus loin l'importance de ces observations simples :

1° Des animaux, vivant dans un milieu de salinité basse ou moyenne et se nourrissant d'algues vertes, sont colorés en vert, vert pâle ou vert vif. Comme ils présentent généralement des dépôts de caroténoïdes, ces animaux ont un aspect très agréable à l'œil ;

2° Des animaux vivant dans des salinités également basses ou moyennes, mais nourris de levure sèche (ce qui raréfie beaucoup l'oxygène), sont colorés en rouge franc, plus ou moins intense, mais pouvant être très vif ;

3° Dans de vieux élevages, contenant des algues, mais nourris à la levure de bière, les animaux deviennent bruns, d'aspect semblable à ceux observés dans les marais salants.

Dans tous les cas, on observe des variations de couleur assez grandes d'un animal à l'autre ; certains sont pratiquement incolores.

Si l'on excepte les caroténoïdes, c'est le sang vu par transparence à travers le tégument qui donne sa couleur à l'animal.

Les pigments sont en solution dans l'hémolymphe et non fixés à des globules, d'ailleurs nombreux ; en effet, une petite quantité de sang, après centrifugation, présente un surnageant de couleur identique à celle du sang total.

Quels sont ces pigments ? — Mes premiers résultats ont été publiés dans une note (J. Dutrieu, 30).

1° Nature.

Les caroténoïdes.

Les carotiprotides. — A l'inverse des embryons jeunes, l'adulte ne paraît pas renfermer de carotiprotides : ni l'alcool bouillant, ni la dessiccation ne font apparaître de couleur rouge ou orangée.

Caroténoïdes libres. — Il arrive souvent que les adultes vivant depuis un temps suffisamment long dans des cultures d'algues présentent des couleurs orangées à l'extrémité de leurs appendices natatoires.

Solubles dans les solvants organiques, par conséquent certainement caroténoïdiques, ces pigments sont-ils constitués comme chez l'embryon par de l'astacène ?

Étant donné la très faible quantité de matériel disponible, seul le spectre d'absorption a été étudié.

Technique. — Les pigments sont localisés dans les appendices. Mais dans le tube digestif se trouvent toujours des débris végétaux contenant des caroténoïdes et de la chlorophylle. Le spectre à plusieurs bandes obtenu par extraction alcoolique éthérée de l'animal total ne peut donc pas être considéré comme dû aux caroténoïdes stockés par l'animal.

Aussi, l'extraction par un solvant organique est-elle précédée de l'extirpation chirurgicale du tube digestif après anesthésie par éther : la main gauche maintenant à l'aide de pinces l'animal en place au niveau des premiers appendices, la main droite saisit la tête et, la séparant du corps, entraîne avec elle le tube digestif.

Un lot assez important (500 à 1000 mg) d'animaux ainsi dépouillés de leur tube digestif, est fixé dans un peu d'alcool, puis séché à l'étuve sous vide à + 30°.

Le résidu d'évaporation est dissous dans un solvant approprié (pyridine, éther de pétrole, chloroforme, alcool). Après filtration, la solution est passée au spectrophotomètre.

Le spectre obtenu est exactement le même que celui obtenu chez l'embryon : *le caroténoïde des Artemia est donc de l'astacène à tous les stades du développement.*

Les pigments de l'hémolymphe.

La présence d'hémoglobine dans l'hémolymphe d'*Artemia salina* est connue depuis longtemps.

Pour la première fois, Lochhead et Lochhead (70) l'identifient avec certitude par spectroscopie.

Gilchrist (46) montre que le taux d'Hb augmente quand le taux d'oxygène dans le milieu ambiant diminue. L'Hb permet à l'animal de supporter des taux très bas en O_2 dans le milieu où il vit.

Gravilescu, Dinischiotu et Mihelits (52) l'identifient par formation de cristaux d'hémine et étudient le rôle de la présence d'Hb sur la consommation d'O_2 de l'adulte.

Ces auteurs ne mentionnent qu'un seul pigment, l'hémoglobine. Pourtant, les couleurs très variées présentées par les animaux font penser soit à un mélange de pigments, soit à la présence d'un pigment de couleur variable.

Comme la présence d'Hb dans le sang paraissait avoir une relation avec la ponte d'œufs durables, j'ai préféré reprendre en détail la question des pigments.

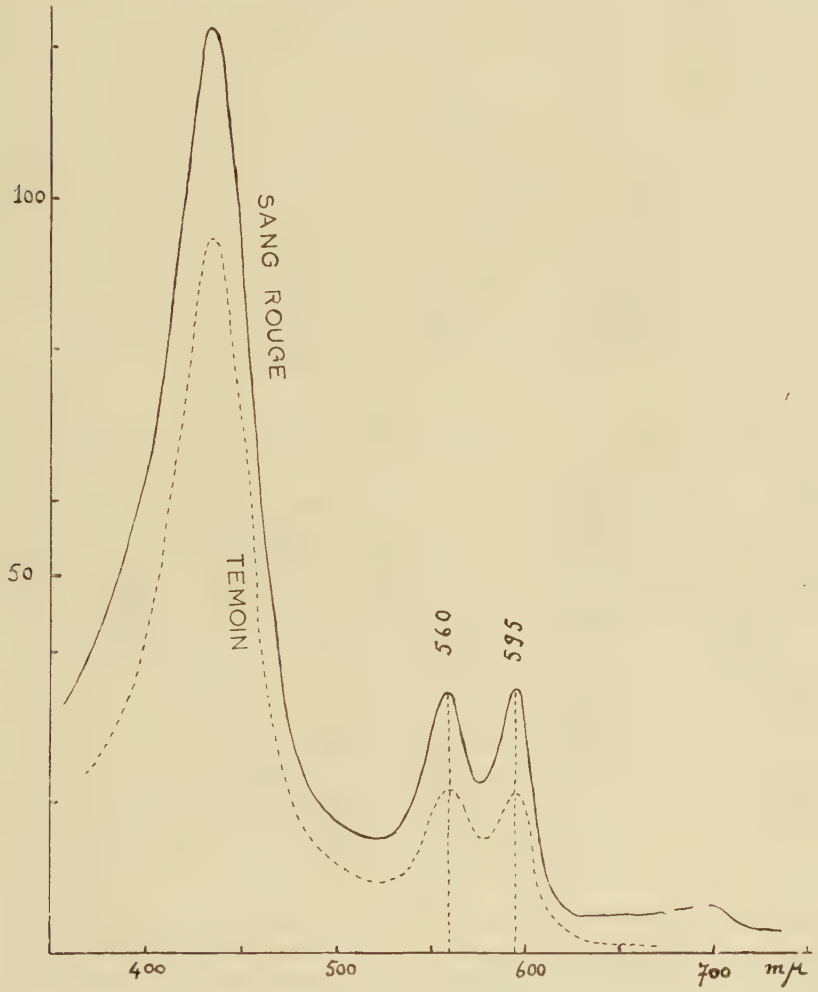
Pour leur identification et leur détection, deux techniques ont été utilisées : la spectroscopie et l'électrophorèse sur papier.

Prélèvement de l'hémolymphe. — Le prélèvement se fait à l'aide d'un tube de verre capillaire, dont l'extrémité cassée en biseau est suffisamment coupante pour perforer le mince tégument de l'animal. Il est préférable d'opérer sous la loupe binoculaire. Dès que la blessure est faite, le sang s'écoule et monte aisément dans le tube capillaire ; le corps de l'animal devient immédiatement flasque. Chez la femelle, la ponction est facile au niveau de la poche ovigère, surtout si celle-ci est vide ; chez le mâle, l'opération est plus délicate ; on peut la pratiquer dans l'abdomen, mais il faut veiller à ne pas perforer le tube digestif dont le contenu pourrait se mélanger au sang. Pour les analyses faites, il a fallu faire appel à un grand nombre de prélèvements.

Étude spectroscopique.

Technique. — Les échantillons de sang sont dilués dans de l'eau distillée : la dilution dépend, d'une part de la sensibilité de l'appareil

utilisé et, d'autre part, de la concentration des pigments de l'hémolymphe : elle est de l'ordre de 1/150 à 1/200e : 5 à 6 adultes de taille moyenne sont nécessaires pour une mesure.



GRAPHIQUE V. — Spectre d'absorption de sangs d'adultes de couleur rouge et spectre témoin d'oxyhémoglobine humaine.

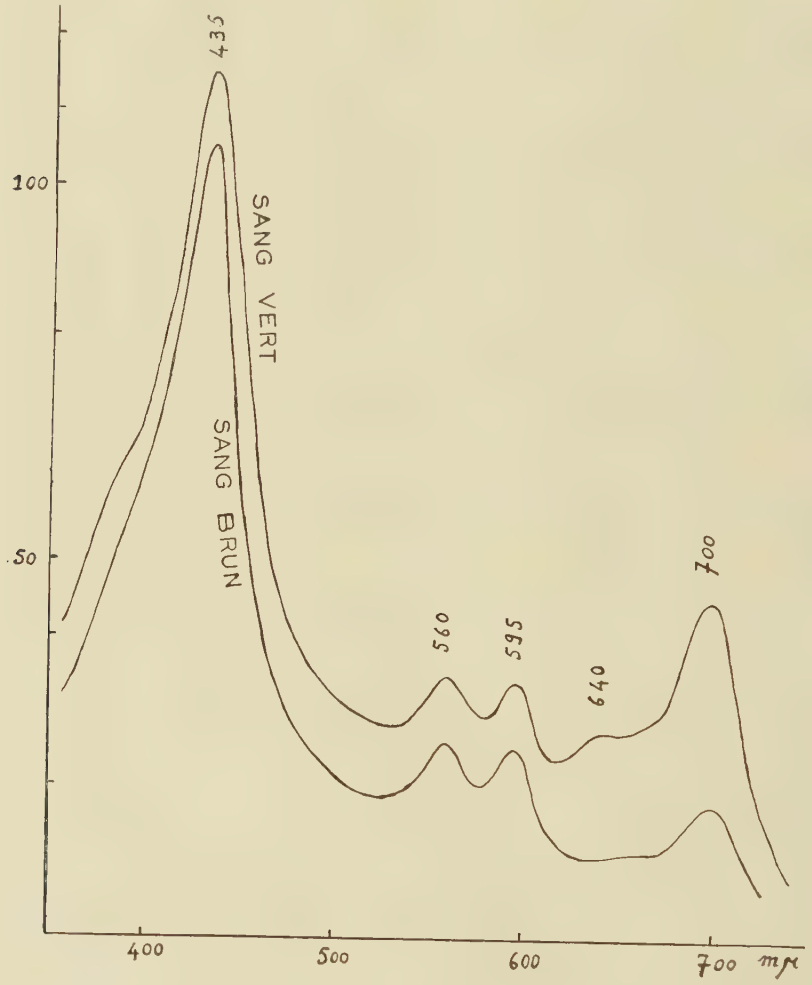
Résultats. — On a étudié successivement :

1° les spectres de sangs rouge vif (graph. V),

2° les spectres de sangs bruns (graph. VI),

3° les spectres de sangs vert vif (graph. VI).

Discussion. — Le spectre n° 1 est typiquement celui de l'Hb O_2 : bandes à 435 mμ, 560 mμ, 595 mμ. Un témoin d'Hb humaine obtenu par lyse d'une goutte de sang dans de l'eau distillée, présente exactement le même spectre (graph. V).



GRAPHIQUE VI. — Spectres d'absorption de sangs d'adultes de couleur verte et de couleur brune.

Dans les spectres de sangs bruns, il apparaît très nettement une bande située à 700 mμ et dont l'intensité relative augmente lorsque le sang des animaux devient de plus en plus vert.

Dans les spectres de sang vert vif, la bande à 700 mμ est très intense, et il en apparaît une petite vers 645 mμ. Nous avons toujours les bandes

caractéristiques de l'Hb O_2. Elles n'ont jamais pu être éliminées complètement, même en utilisant des sangs franchement verts d'animaux vivant dans des cultures d'algues bien oxygénées ; leur importance diminue cependant grandement et Lochhead (70) dit ne pas avoir détecté le spectre de l'Hb chez les animaux à sang incolore ou verdâtre.

La couleur verte des animaux est donc liée au pigment dont les bandes d'absorption se trouvent à 700 mμ et 645 mμ. Quel-est-il ? C'est probablement de la chlorophylle. En effet, la chlorophylle *a* possède de nombreuses bandes dont les plus intenses sont à 460, 630 à 640 et 700 mμ (en tenant compte de la déviation de 10 à 15 mμ due au photomètre Jouan). La chlorophylle *b* possède ses bandes maximum à 500 et 660 mμ (avec la même correction de 10 à 15 mμ). La bande située vers 460 mμ se trouve confondue avec l'énorme bande de l'Hb située à 435 mμ ; seules restent visibles les bandes situées en dehors du spectre de l'Hb.

Chez les animaux nourris exclusivement de levure de bière et dont le milieu d'élevage est absolument dépourvu d'algues, il n'y a pas traces de bandes d'absorption à 700 mμ.

La méthode spectroscopique, bien que très utile, est insuffisante ; elle ne permettrait pas de dissocier des pigments voisins, dont les spectres peuvent interférer ou se confondre. C'est pourquoi j'ai aussi utilisé la microélectrophorèse sur papier.

Microélectrophorèse sur papier.

Technique (Loiseleur, Wunderly (110)). — L'appareil utilisé est l'appareil Quéré à microélectrophorèse sur papier.

On opère sur des feuilles de papier Whatman n° 1 découpées en bandes de 30 × 6 cm sur lesquelles on peut juxtaposer II à III gouttes de sang à étudier.

Le tampon utilisé est le tampon pH 6,8 au véronal-véronal sodique (formule : véronal sodique 10,3 g, véronal acide 1,84 g, eau distillée q. s. p. 1000 cm^3). Le temps de migration nécessaire pour obtenir un bon étalement est de cinq heures. Après fixation par le chlorure mercurique, la révélation des taches protéiques se fait par le bleu de bromophénol, d'après la technique couramment utilisée pour le sérum sanguin.

Le sang des *Artemia*, en vue de simplification, n'est pas préalable-

ment centrifugé ; les globules restent fixés à leur point de départ et ne gênent en rien la netteté de l'électrophorégramme. La même quantité de sang est utilisée dans toutes les électrophorèses afin de permettre des comparaisons quantitatives ; elle est mesurée à l'aide d'une pipette hématimétrique.

Les substances étudiées étant des pigments, elles sont parfaitement visibles sur le papier en fin d'électrophorèse, en ayant gardé leur couleur propre. Aussi, les résultats ont toujours été lus et annotés avant la révélation. Celle-ci, en effet, révèle uniformément toutes les protéines par la même coloration bleue. Bien que présentant cet inconvénient, la révélation est cependant indispensable : elle permet une interprétation quantitative bien meilleure, et surtout la conservation illimitée des électrophorégrammes en vue de comparaisons ultérieures.

Résultats. — Un fait important est immédiatement mis en évidence : *les pigments sont les seules protéines sanguines* existant en quantités décelables dans les conditions de l'expérience.

L'électrophorèse met très nettement en évidence la présence de deux pigments rouges, très probablement deux hémoglobines différentes que nous appellerons R_1 et R_2 et d'un seul pigment vert, V, la chlorophylle précédemment mise en évidence.

R_1 est la protéine migrant le plus rapidement, c'est-à-dire de plus faible poids moléculaire.

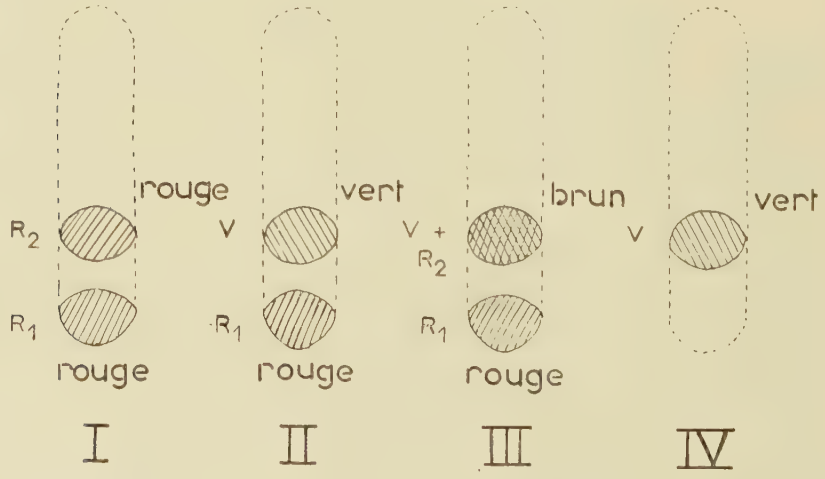


Fig. 3. — Schémas des électrophorégrammes de sangs de différentes couleurs : I : Sang rouge vif. II : Sang brun. III : Sang brun rouge. IV : Sang vert.

R_2 migre plus lentement.

V migre à peu près à la même vitesse que R_2. Lorsqu'ils sont présents simultanément, leur emplacement est marqué par une tache brune.

R_1, R_2 et V existent en quantités relatives très variables. Nous pouvons schématiser les différentes électrophorèses comme il est indiqué fig. 3.

Il m'a paru alors intéressant de faire les spectres des pigments ainsi isolés les uns des autres.

Spectres des pigments isolés électrophorétiquement.

Technique. — Une quantité importante de sang est placée sur le papier, non plus sous forme de goutte, mais en une bande continue.

Pour l'étude de R_2, on a choisi des animaux privés de chlorophylle, mais rouge vif (de préférence des mâles, nous verrons plus loin l'explication de ce choix).

Pour l'étude de V, ce sont au contraire des animaux verts ou brun-verdâtre (de préférence des femelles pondant des œufs durables).

R_1 est, dans tous les cas, facilement isolable.

Lorsque l'électrophorèse est terminée, on découpe la portion de la bande de papier renfermant le pigment à étudier. Le morceau de papier, placé dans une petite quantité d'eau ou de solution tampon et légèrement malaxé, lui cède son pigment.

On observe directement au spectrophotomètre (v. graph. VII).

Résultats. — R_1 présente le spectre de l'oxyhémoglobine.

R_2 présente le même spectre.

V présente celui de la chlorophylle.

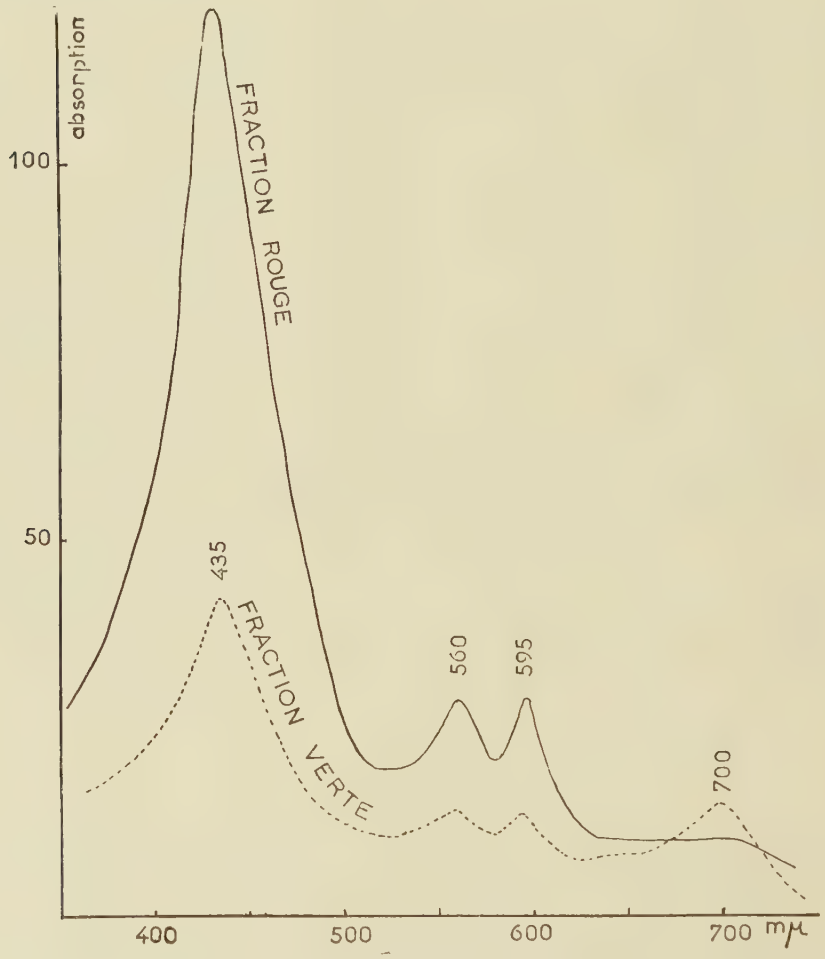
Ces résultats confirment ceux déjà donnés par la spectroscopie directe de l'hémolymphe. De plus, ils montrent que R_1 et R_2 sont bien deux hémoglobines voisines. Leurs spectres étant semblables (c'est celui du groupement hème) elles ne peuvent différer que par leur groupement protéique, R_2 ayant un poids moléculaire supérieur à celui de R_1.

Résumé et conclusion. — A l'exclusion de toute autre protéine en quantités importantes, le sang d'*Artemia salina* est susceptible de renfermer trois pigments protéiques appartenant à deux catégories bien différentes :

1° deux hémoglobines différant par le poids moléculaire de leur globine,

2° de la chlorophylle.

C'est le mélange en quantités relatives extrêmement variables de ces deux catégories de pigments qui donne à chaque individu sa couleur caractéristique.



Graphique VII. — Spectres d'absorption des fractions rouge et verte séparées par électrophorèse.

2° Origine.

L'expérimentation est délicate et longue pour les raisons suivantes :

1° Difficulté d'avoir des milieux d'élevages absolument dépourvus d'organismes végétaux ; la contamination est très facile (cas des vieux élevages) ;

2° Temps de latence important dans l'apparition des caractères chez les animaux. Cette lenteur dans l'apparition des caractères oblige à conserver les animaux longtemps dans le milieu d'élevage, ce qui entraîne un risque de contamination.

Caroténoïdes.

On sait actuellement avec certitude que les animaux supérieurs ne peuvent synthétiser les caroténoïdes. Mais il se pourrait que certains organismes inférieurs en aient le pouvoir. L'astacène, caroténoïde spécifiquement animal, dérive-t-il obligatoirement, chez *Artemia* d'une nourriture végétale ?

Pour le montrer, les animaux sont soumis à des régimes exclusivement à base de levure de bière.

Tests de mise en évidence. — *a*) apparition de taches orangées sur les appendices ;

b) coloration des embryons, c'est un test important.

Nous avons déjà vu que chez l'embryon très jeune, les caroténoïdes étaient combinés à des protéines et donnaient une coloration gris bleuâtre à l'embryon. Le nauplius devient ensuite orangé et présente une belle couleur au moment de la ponte.

Observations.

a) *Élevages bien ou mal oxygénés, mais abondamment pourvus d'algues* (la nourriture doit être abondante et si l'on part d'animaux adultes sans caroténoïdes, les caractères sont longs à apparaître).

1° On observe les taches orangées. Elles deviennent d'autant plus abondantes que l'animal est depuis plus longtemps dans un milieu très riche en algues.

2° L'embryon :

— Avant le stade prénauplius (gastrule avancée), l'embryon peut revêtir deux aspects différents :

a) Il a un aspect gris bleuâtre plus ou moins intense mais très net ; par chauffage ou *simple dessiccation*, ou traitement par l'alcool, il devient intensément coloré en orangé : il contient donc des carotiprotides ;

b) il est déjà coloré en orangé par des caroténoïdes libres. Dans mes élevages, je n'ai observé ce cas qu'exceptionnellement, chez des animaux soumis depuis longtemps à une nourriture riche en végétaux.

Dans la nature par contre, j'ai souvent observé des femelles dont les ovocytes sont fortement colorés ; on peut supposer que l'embryon contient un excès de caroténoïdes libres qui masque les carotiprotides.

— A partir du stade prénauplius, *l'embryon, puis le nauplius sont toujours colorés en orangé. Je n'ai jamais observé de nauplius gris-bleuâtre* qui, par dessiccation, deviennent orangés. L'intensité de la couleur orangée est variable avec la quantité de caroténoïdes mis à la disposition de l'embryon par l'organisme maternel.

Il faut admettre qu'au stade nauplius, il y a rupture de la liaison entre le caroténoïde et la protéine.

Cette observation n'est possible que si les embryons ne possèdent pas d'excès de caroténoïdes libres qui, cachant les carotiprotides, masque leur libération au stade d'organisation du nauplius. Dans mes élevages, c'est la pauvreté relative en algues et surtout le temps restreint d'exposition de la mère à cette nourriture, qui a permis l'observation de ce cas limite.

b) *Élevages rigoureusement dépourvus de caroténoïdes.* — La nourriture est constituée uniquement par de la levure de bière. Le milieu est alors très pauvre en oxygène et les animaux très riches en hémoglobine :

1° aucune tache n'est visible sur les appendices ;

2° embryons et nauplius à la ponte sont toujours d'un blanc laiteux. Leur dessiccation ne libère jamais de caroténoïdes quel que soit le stade du développement. Aucun virage n'est observé au stade pré-nauplius.

En conclusion, il semble qu'*Artemia salina* soit incapable de synthétiser des caroténoïdes ; les caroténoïdes végétaux provenant de la nourriture sont cependant transformés en astacène, caroténoïde spécifiquement animal.

Chlorophylle. — La chlorophylle est évidemment d'origine végétale ; comme telle, elle sert d'*indicateur de la présence de caroténoïdes* : s'il y a de la chlorophylle dans le sang d'un animal, il est certain que son organisme contient au moins de petites quantités de caroténoïdes :

a) dans un élevage dépourvu d'algues, les animaux sont soit incolores, soit roses ou rouges. Dans de vieux élevages contaminés par des algues, les animaux deviennent bruns ;

b) dans un élevage riche en algues, les animaux sont d'un vert

franc plus ou moins vif. Il est à noter qu'ils sont rarement d'un vert intense, même s'ils ont vécu longtemps dans le milieu.

L'hémoglobine. — Les travaux de GILCHRIST ayant bien montré le rôle de la concentration d'oxygène sur la synthèse de l'hémoglobine chez *Artemia salina*, je préciserai ici seulement quelques points.

Rôle de la concentration en oxygène et de l'augmentation de salinité. — Lorsque la salinité augmente, il y a synthèse d'hémoglobine. En fait, la salinité n'agit qu'en raréfiant l'oxygène du milieu et, encore plus, en diminuant son taux au niveau tissulaire, une partie de l'oxygène étant utilisée pour fournir l'énergie nécessaire au maintien de l'équilibre osmotique.

En effet, une diminution de l'oxygénation du milieu, non accompagnée d'une augmentation de salinité, entraîne l'apparition de l'hémoglobine.

GILCHRIST, pour montrer cela, fait barbotter de l'N dans l'eau d'élevage.

Dans mes élevages de salinité basse, mais nourris de levure de bière, la fermentation de celle-ci fait disparaître rapidement l'oxygène. Les animaux sont alors intensément rouges.

Rôle de la nourriture. — Il semble que l'insuffisance d'O_2 ne soit pas suffisante pour faire apparaître l'hémoglobine.

C'est ainsi que j'ai conservé, pendant plusieurs mois des élevages dont l'eau s'était concentrée et contenait une culture spontanée de bactéries. Le milieu étant absolument dépourvu d'algues et de levure de bière, ces bactéries constituaient la seule nourriture des *Artemia*. Celles-ci étaient parfaitement incolores ou blanchâtres et se reproduisaient intensément par viviparité. Je n'ai malheureusement pas fait le spectre de leur hémolymphe.

Aussi, il est probable que l'hémoglobine ne peut être que partiellement synthétisée : certaines molécules devant être apportées par la nourriture.

Le cas d'*Artemia* se rapprocherait ainsi de celui des Daphnies, chez lesquelles VERNE (104) trouve que l'hémoglobine est synthétisée seulement dans le cas où la nourriture contient de la chlorophylle et du fer.

Pour LOCHHEAD (70) cependant, chez *Artemia* la synthèse serait possible car il a trouvé le spectre de l'hémoglobine chez des animaux

nourris dès leur naissance par de la levure (qui, en fait, contient du cytochrome), des bactéries, des protozoaires incolores et des détritus où aucun organisme vert n'est visible. Il remarque cependant que les animaux très rouges ne peuvent être obtenus qu'à partir d'une nourriture verte.

Rôle de la température. — Elle agit surtout par son action sur la concentration saline et, partant, sur la teneur en oxygène ; par ailleurs la solubilité de ce dernier diminue lorsque la température augmente. Elle active également le métabolisme et favorise ainsi ses transformations.

Conclusions. — Les *Artemia* peuvent vivre et se reproduire en étant parfaitement incolores.

En général, cependant, leur nourriture et leur milieu de vie sont susceptibles de faire apparaître des pigments dans leur organisme.

L'hémoglobine (en fait, deux hémoglobines distinctes par le poids moléculaire de leur globine) ne se forme que si l'apport d'oxygène est insuffisant et à la condition que le milieu extérieur apporte certains matériaux nécessaires à l'édification de la molécule.

La synthèse de l'hémoglobine peut donc être considérée comme une adaptation au manque d'oxygène. Le pigment, une fois synthétisé, garde-t-il un rôle respiratoire important si la fourniture d'oxygène redevient suffisante ?

Nous verrons qu'il est difficile de répondre à cette question. En tout cas, en enrichissant l'hémolymphe en grosses molécules protidiques, l'hémoglobine doit jouer un rôle dans l'équilibre osmotique.

Les caroténoïdes, d'origine exogène, sont essentiellement représentés par de l'astacène, caroténoïde par ailleurs très répandu chez les crustacés. L'adulte ne contient pas de carotiprotides ; l'embryon, par contre, en est abondamment pourvu. Nous avons vu que, jusqu'au stade de gastrule avancée, l'astacène est combiné à des protéines, mais qu'au moment de l'organisation du nauplius, il en est libéré ; on peut se demander si, par là-même, il ne joue pas un rôle actif dans le développement.

CHAPITRE V.

CONDITIONS D'APPARITION DE L'OVIPARITÉ ET DE LA VIVIPARITÉ

Aucune étude particulière n'a été faite sur les conditions régissant les modes de reproduction (oviparité ou viviparité). Tout au plus, trouve-t-on au hasard des travaux consacrés à *Artemia*, quelques indications se rapportant à ce sujet.

Pour KUENEN (64) (1939) : « Aucune attention n'a été apportée à la question de savoir pourquoi les femelles sont ovipares ou vivipares ; mais certainement les deux cas sont observés dans les cultures... Je pense que la viviparité est le mode de reproduction le plus courant ». Rappelons que KUENEN utilisait une eau de salinité faible (58 ‰ de Cl Na), une température basse (22°) et une nourriture d'algues.

Pour LOCHHEAD (71) (1941) : « Il paraît évident que les facteurs externes déterminent soit l'oviparité, soit la viviparité à n'importe quel moment chez la femelle adulte. On ne connaît pas encore quels sont ces facteurs. »

Pour BARIGOZZI (3) (1939) : « La production de nauplius vivants et d'œufs durables est observée simultanément et, contrairement à ce qui a été assuré par de nombreux auteurs, il ne semble pas que la production d'œufs durables soit liée à une concentration saline élevée ; l'*oviparité* a été observée d'une *façon prépondérante* chez les femelles amphigoniques, dans des élevages de basse concentration saline ». Ces élevages, dont la température n'est pas indiquée, sont à la salinité relativement élevée de 73 ‰ de Cl Na et nourris d'algues. BARIGOZZI note également que « si les algues se multiplient bien, la nourriture est bonne et les *animaux sont roses*. Si la nourriture est rare, les animaux pâlissent et leur croissance est retardée. »

Encore en 1957, BARIGOZZI répète que « on n'a pu, jusqu'à présent, trouver la cause déterminant la viviparité ou l'oviparité ».

Évidemment, une telle diversité dans les observations rend diffi-

ciles des conclusions sur les causes de l'oviparité et de la viviparité. Cependant, un fait a orienté facilement ce travail. Nous avons vu que pour LOCHHEAD la destinée d'une ponte dépendait de l'épaisseur de la coque destinée à entourer l'embryon : si seulement une mince enveloppe l'entoure, la femelle est vivipare ; si une épaisse coque se forme, c'est un œuf immédiat ou durable qui sera pondu.

Or, nous avons vu d'une part que le pigment de la coque est de nature hématinique et d'autre part que l'adulte présente souvent, mais non nécessairement, de grandes quantités d'hémoglobine dans son sang.

On pouvait donc, à priori, supposer qu'en l'absence d'hémoglobine dans son sang, la femelle serait vivipare, alors que si elle en renferme de grandes quantités, elle l'éliminerait par ses glandes coquillières sous forme de coque et pondrait alors des œufs. Une observation semble appuyer cette hypothèse : les mâles gagnent mais aussi perdent plus difficilement leur hémoglobine que les femelles.

Mais un tel phénomène d'élimination de l'hémoglobine n'implique pas obligatoirement la ponte d'œufs. Remarquons en outre que cette hypothèse, si elle permet d'expliquer la présence de coques brunes, ne laisse pas prévoir l'existence d'œufs en diapause, mais seulement d'œufs immédiats.

Quant à ce travail, il faut remarquer qu'il a été fait entièrement sur des élevages artificiels en aquarium dont les conditions de vie sont nécessairement éloignées des conditions naturelles ; par là même, d'ailleurs, elles permettent une plus grande étendue d'observations, les conditions naturelles n'étant qu'un cas particulier parmi d'autres nombreux cas possibles.

Mes premières observations ont été publiées dans une note (30).

1° Méthodes d'étude.

Des séries d'élevage sont mises en train dans des conditions d'oxygénation et de nourriture telles que l'on provoque l'apparition ou, au contraire, la disparition de l'hémoglobine chez l'animal. On observe les poches ovigères et les pontes des femelles vivant dans ces élevages.

Obtention d'élevages destinés a contenir des femelles privées d'hémoglobine.

L'oxygénation devant être abondante est obtenue par un des moyens suivants :

1° par basse concentration saline (53 °/₀₀ en Cl Na) ;

2° par une culture d'algues ;

3° par une oxygénation artificielle : le barbotage quotidien utilisé dans mes élevages n'est pas suffisant. Il faut un très léger barbotage continu dans l'aquarium.

La nourriture : en principe, elle peut être quelconque si l'oxygénation est suffisante. Cependant, la levure est à déconseiller car elle diminue considérablement le taux d'oxygène : seule une oxygénation intense peut compenser son action.

De préférence, la nourriture à fournir dans ce cas est une culture de *Chlamydomonas*.

Obtention d'élevages destinés a contenir des femelles riches en hémoglobine.

L'oxygénation très faible doit juste suffire à maintenir la survie de l'animal. Elle est obtenue par un des moyens suivants :

1° par une salinité élevée (au moins 100 °/₀₀ en Cl Na),

2° par addition de levure de bière dans une salinité basse,

3° par vieillissement d'une eau d'élevage.

La nourriture :

1° la levure sera l'alimentation idéale,

2° le cytochrome C peut la remplacer,

3° les algues sont utilisables dans les salinités élevées.

Les résultats ont été souvent difficiles à interpréter, surtout au début de ce travail. Les caractères recherchés n'apparaissent que lentement, les variations individuelles peuvent être grandes.

Dans mes élevages, opérant dans l'ensemble à une salinité basse et avec une nourriture exclusivement constituée de levure de bière,

j'ai observé une prédominance, voire même une totalité de viviparité. Expérimentalement, à partir de ces femelles vivipares, on obtient assez rarement un élevage exclusivement ovipare, mais seulement un élevage contenant un très fort pourcentage de femelles opivares. De plus, il est quelquefois difficile de réaliser les conditions extérieures recherchées.

Sur chacun des élevages étudiés (28°) étaient faites les observations et les mesures suivantes :

1° La mesure des taux d'oxygène dans le milieu par la méthode de Nicloux ;

2° L'observation de la couleur des animaux : l'étude spectroscopique n'aurait été intéressante que si elle avait été quantitative ;

3° L'observation des embryons dans la poche ovigère ;

4° L'électrophorèse des sangs des femelles et des mâles.

2° Observations.

Animaux privés d'hémoglobine.

A. — Une eau de mer additionnée de 15 °/₀₀ de Cl Na (53 °/₀₀ en Cl Na) est additionnée d'une culture de *Chlamydomonas* qui s'y multiplie.

Le taux d'oxygène est de 4 à 4,5 cm³/litre.

Les animaux, d'un vert pâle, ne contiennent pas d'hémoglobine décelable à l'œil nu. Les femelles se reproduisent assez mal, mais toujours par *viviparité*. Les embryons, renfermant des carotiprotides dans les jeunes stades, sont pondus à l'état de nauplius orangés.

L'électrophorèse du sang de ces animaux révèle une pauvreté très grande en protéines. Seule, une faible tache de pigment vert est décelable.

B. — *L'élevage précédent* est additionné de Cytochrome C.

Voici les observations telles qu'elles ont été enregistrées :

10 juillet :

L'eau d'élevage (3 litres) provenant d'une culture d'algues (53 °/₀₀ en Cl Na), renferme 4 cm³ d'O_2/litre.

Les animaux provenant d'un élevage nourri par des algues sont

incolores ou vert pâle, vivipares, et l'électrophorèse de leur sang montre seulement un peu de V.

En fait, nous sommes dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente.

On additionne ce milieu de cytochrome C à raison de 50 mg tous les jours.

15 juillet :

L'eau reste verte et ne se colore pas en rouge.

Les animaux sont toujours vert pâle.

Les femelles sont toujours vivipares.

L'électrophorèse montre toujours un sang pauvre en protéines, avec un léger clocher de V.

La teneur en oxygène est un peu abaissée : 3,5 cm^3 d'O_2/l.

19 juillet :

La teneur en O_2 remonte : 4,5 cm^3 d'O_2/l.

L'aspect et les caractéristiques des animaux sont les mêmes.

23 juillet : Observations identiques.

L'élevage encore conservé pendant 15 jours n'a présenté que des femelles *vivipares*, de couleur vert pâle.

C. — *Eau de salinité basse* (53 $^0/_{00}$ en Cl Na) additionnée de levure, mais avec barbotage d'oxygène continu.

Les résultats ne sont pas probants. Il a été difficile d'obtenir une bonne oxygénation ; celle-ci a été très irrégulière ; montée à 11,5 cm^3/l, elle a coïncidé avec une mortalité très élevée des animaux.

Les femelles, roses, sont *vivipares*.

D. — *Élevages de salinité basse* : (53 $^0/_{00}$ en Cl Na), oxygénés par barbotage continuel d'O_2 et additionnés de Cyto C. Les femelles proviennent d'élevages nourris par des algues ; elles sont à l'origine vivipares, avec un sang très pauvre en protéines.

Les observations poursuivies pendant 12 jours avec des oxygénations variables mais voisines de 5,5, cm^3/l, sont caractérisées par une mortalité élevée.

Les femelles restent pâles et *vivipares*.

Animaux pourvus d'hémoglobine.

A. — *Vieux élevages nourris par des algues.* — La salinité s'est beaucoup élevée par suite de l'évaporation et est de l'ordre de 100 à 120 ‰ de Cl Na.

La teneur en O_2 est basse (1,5 $cm^3/l.$), mais variable.

Les animaux bien nourris sont de grande taille, de couleur verte assez franche.

Certaines femelles pondent des *œufs brun clair.*

A *bis.* — *De vieux élevages analogues aux précédents,* mais additionnés de levure de bière.

Au départ, un élevage vieux de 40 jours environ, richement pourvu d'algues, ayant eu des quantités élevées de levure, a son taux d'oxygène dangereusement bas (0,35 cm^3/l).

Les animaux, très vivaces, sont colorés en brun-vert.

Certaines femelles portent des embryons *vivipares,* mais d'autres portent des *œufs brun très clair.*

Une addition d'une culture d'algues, fait remonter le taux d'O_2 à 2,5 cm^3/l.

Cinq à six jours plus tard, certaines femelles portent des *œufs bruns* à coque épaisse.

L'électrophorèse montre un aspect semblable pour les femelles à œufs blancs et les femelles à œufs bruns. R_1 est assez abondant, V est abondant, mais R_2 reste absent. Malheureusement, l'électrophorèse des mâles n'a pu être faite faute d'un nombre suffisant d'individus.

B. — *Un élevage dans une eau de mer de salinité basse* est mis en train avec des femelles vivipares provenant d'un élevage nourri par des algues. Le nouvel élevage n'est pas nourri : on lui ajoute seulement du Cyto C.

Voici les observations :

15 juillet :

Les animaux sont pâles, *vivipares,* leur sang est très pauvre en protéines, comme le montre l'E. P. : le taux d'oxygène est de 4 cm^3 d'O_2/l.

On ajoute du Cyto C, à raison de 50 mg/4 litres par jour.

17 juillet :

L'eau est rouge.

Le taux d'O_2 s'abaisse à 2 cm³ d'O_2/litre.

Les animaux sont toujours pâles ; la majorité des femelles est *vivipare* ; cependant deux ou trois femelles présentent des *œufs bruns* tout en restant elles-mêmes pâles.

19 juillet :

Le taux de O_2 s'abaisse encore à 1,5 cm³/l.

Les animaux sont encore pâles dans l'ensemble. Certains commencent cependant à acquérir une très légère teinte *rose.*

Certaines femelles, bien que de petite taille, portent des *œufs bruns* dans leurs poches ovigères. Le pourcentage de ces femelles est assez élevé : 40 % environ.

21 juillet :

Les femelles présentent nettement des *œufs brun-sombre* ; elles rosissent.

La teneur en O_2 est de 1,5 cm³/l.

23 juillet :

Même observation.

L'électrophorèse du sang des femelles portant des œufs bruns, montre la présence de R_1 et de V en grande quantité.

C. — *Cas de la majorité des élevages en aquarium.* — La salinité est basse.

La nourriture est constituée exclusivement de levure de bière.

Le taux d'oxygène, très faible, est maintenu par un barbotage quotidien.

Les animaux, *très riches en Hb,* ont une couleur rouge-vif franche.

Mais les femelles sont *vivipares* et pondent des *nauplius blancs.*

L'électrophorèse va donner des résultats intéressants : que l'on considère les sangs de femelles vivipares, de jeunes femelles n'ayant pas encore pondu, ou de mâles, toujours on trouve *R_1 et R_2 en abondance et une totale absence de V.*

C *bis.* — *Vieux élevages précédents.* — Les élevages précédents, lorsqu'ils vieillissent, contiennent des individus de *couleur brune* ; les femelles sont généralement *ovipares,* leur poche ovigère étant bourrée d'œufs à la coque très sombre.

Les femelles vivipares présentes sont d'un beau rouge vif ; les mâles sont bruns ou rouges.

Les résultats de l'E. P., très significatifs, sont les suivants ;

— les femelles ovipares (brunes) : présence de R_1, de V, mais absence de R_2 ;

— les femelles vivipares (rouges) : présence de R_1, de R_2 en abondance, absence de V ;

— les mâles (bruns ou rouges) : présence de R_1 et surtout de R_2 *en abondance*, masquant V s'il existe ;

— les femelles très jeunes, ne pondant pas (rouges ou brunes), présentent la même E. P. que les mâles.

Les œufs bruns des femelles sont en diapause et ne peuvent éclore qu'après dessiccation.

3° Discussion et conclusions.

Que montrent ces observations ?

La présence d'hémoglobine dans le sang maternel ou, tout au moins, la réalisation des conditions extérieures nécessaires à son apparition, semble favorable à l'apparition des œufs durables. Cependant, l'expérience montre que des femelles bourrées d'hémoglobine, restent parfaitement vivipares : c'est d'ailleurs le cas de la majorité de mes élevages. Ce cas, très net, était en contradiction avec l'idée d'élimination d'Hb par les glandes coquillières.

Cependant, dans ces mêmes élevages, mais à condition qu'ils soient *anciens*, les femelles deviennent parfaitement ovipares : les œufs, entourés d'une coque brune, ne peuvent éclore qu'après dessiccation.

J'ai alors comparé les femelles vivipares aux femelles ovipares afin de voir ce qui les différenciait.

A. — Dans les élevages récents (où les femelles sont vivipares).

a) L'hémoglobine R_2 existe en très grande abondance.

1° chez les mâles de couleur rouge,

2° chez les femelles vivipares,

3° chez les jeunes femelles qui ne pondent pas encore.

b) Le pigment vert (chlorophylle) n'est jamais présent.

c) L'hémoglobine R_1 existe en beaucoup plus faible proportion que R_2.

B. — Élevages anciens (où les femelles sont souvent ovipares).

a) L'Hb R_2 existe seulement, mais en grande abondance :

1° Chez les mâles de couleur rouge ou brune (R_2 masque alors V sur les électrophoregrammes où l'on voit sur leur emplacement une tache brune) ;

2° chez les femelles vivipares qui sont toujours rouges mais jamais brunes ;

3° chez les jeunes mâles et les *jeunes femelles.*

b) L'Hb R_2 *n'existe jamais* (au moins en quantité décelable) *chez les femelles ovipares* ; celles-ci, d'un brun plus ou moins verdâtre, doivent leur couleur rouge à la présence de R_1.

c) La couleur brun-verdâtre des animaux est due à la présence de V.

Les femelles ovipares renferment toujours V mais jamais R_2. *Les femelles vivipares ne renferment jamais de V, mais renferment toujours* R_2 *lorsqu'elles sont rouges.*

Il semble donc que la présence d'Hb dans le sang soit nécessaire à la ponte d'œufs, mais elle n'est pas suffisante. Son élimination ne se fait que si l'animal renferme de la chlorophylle dans son sang. Cette chlorophylle n'est sans doute que le témoin d'une autre substance apportée par la nourriture végétale et indispensable à l'élimination de l'Hb. Les vieux élevages, contaminés la plupart du temps par des algues, apportent aux femelles cette nourriture indispensable. C'est principalement l'élimination de R_2 qui est responsable de la formation de la coque. En effet, les femelles ovipares en sont dépourvues, alors que les mâles et les femelles vivipares des mêmes élevages en sont abondamment pourvus.

D'autres élevages ont été faits afin de vérifier cette hypothèse.

J'ai toujours constaté que, dans les élevages nourris exclusivement de levure de bière et absolument dépourvus d'algues, tous les animaux sont d'un rouge franc plus ou moins intense et les femelles sont toujours vivipares. Si on fournit alors à ces animaux des algues en abondance, les femelles, de rouges et vivipares qu'elles étaient, ne tardent pas à devenir brunes et ovipares : l'hémoglobine R_2 disparait de leur sang.

Inversement, des animaux nourris d'algues prennent une couleur verte ; une adjonction abondante de levure diminue le taux d'O_2 et, apportant le groupement hème, transforme alors toutes les femelles vertes jusqu'alors vivipares, en femelles ovipares brunes.

Le phénomène est très net. Il est facilité et activé par une température élevée : à 28°, la transformation est rapide (6 à 8 jours), alors qu'à 20-22°, elle est beaucoup plus lente, 15 jours en moins.

Cette explication de l'apparition de l'oviparité est en accord avec les observations éparses de différents auteurs exposées au début de ce chapitre.

Résumé.

On peut se représenter la ponte d'œufs durables de la façon suivante :

1° Si les femelles nourries d'algues vivent dans un milieu bien oxygéné, elles ne synthétisent pas d'Hb. Leur sang, très pauvre en protéines, ne renferme que de petites quantités de chlorophylle. La femelle, n'éliminant pratiquement rien par ses glandes coquillières, est vivipare. Les nauplius pondus contiennent de l'astacène provenant de la nourriture végétale maternelle.

2° Si le milieu s'appauvrit en oxygène, le sang de la femelle s'enrichit en deux hémoglobines distinctes : R_1 et R_2. R_2 est éliminée par les glandes coquillières sous forme de coques brunes qui entourent l'embryon : la femelle est ovipare.

Chez les mâles et les jeunes femelles qui ne pondent pas encore, R_2, qui ne peut être éliminée, se retrouve en très forte proportion dans le sang.

3° Si la nourriture n'apporte ni chlorophylle, ni caroténoïdes, ce qui est le cas de la levure, l'élimination de R_2 ne se fait pas : les femelles restent vivipares et R_2 s'accumule dans leur sang. L'élimination de R_2 est donc sous la dépendance d'un facteur apporté par une nourriture chlorophyllienne.

4° Une température élevée paraît favoriser la rapidité de cette élimination.

Le cas d'*Artemia salina* est assez différent de celui d'un crustacé voisin, *Daphnia*. Chez les daphnies, l'œuf d'été contient, outre un carotiprotide, une hémoglobine intraovulaire (Teissier, 94), ce qui n'est

pas le cas d'*Artemia* où l'Hb est trouvée seulement dans la coque. Comme *Artemia*, la daphnie synthétise l'hémoglobine lorsque le milieu s'appauvrit en oxygène (Fox (40) ; Fox, Phear (42) ; Green (54)), mais perd rapidement cette même Hb, lorsque l'oxygène réapparaît dans le milieu. Un certain nombre de travaux récents sur l'élimination de cette Hb montrent que, d'une part, elle est éliminée par l'intermédiaire de l'embryon qui en est ainsi enrichi (les femelles pâlissent d'autant plus vite qu'elles pondent davantage d'œufs, Dresel (23)), et que, d'autre part, si l'animal ne pond pas, l'Hb est détruite (ce fait est très intéressant) au niveau des cellules graisseuses de l'organisme avec libération de Fe (Green, 53). Pour Smaridge (91), la synthèse et la destruction de l'Hb se feraient au niveau des ovaires et des cellules graisseuses : « Dans les cellules graisseuses, l'Hb peut être accumulée et est probablement détruite à cet endroit avec libération de Fe ; celui-ci est ensuite excrété ». Cela permet de supposer que synthèse et destruction de l'Hb sont sous la dépendance, chez *Daphnia* tout au moins, d'un facteur liposoluble.

Hypothèse sur l'établissement de la diapause.

Le résultat précédent n'explique pas l'apparition d'œufs en diapause. Il explique seulement la ponte d'œufs immédiats. Cependant, une série d'observations permet d'envisager une cause de la diapause.

Voici ces observations (un bon nombre d'entre elles ont déjà été exposées à l'occasion de l'étude d'autres questions) :

1° Les œufs durables n'éclosent qu'après dessiccation.

2° Une action de la dessiccation sur la perméabilité de la coque entraînant la rupture de la diapause, est à rejeter ; en effet, seuls l'oxygène et l'eau sont indispensables à l'éclosion ; or la coque de l'œuf en diapause est perméable à l'eau, puisqu'elle permet la déshydratation à l'air libre ou en solutions hypertoniques ; donc, à plus forte raison, l'est-elle à l'oxygène. L'œuf en diapause ne peut donc manquer ni d'eau ni d'oxygène, seuls facteurs indispensables à l'éclosion.

3° Les nauplius vivipares libèrent l'astacène de sa combinaison protidique au moment de leur organisation.

4° Sur les embryons jeunes non entourés de coque et portés par les femelles vivipares, la dessiccation à la température du laboratoire assure la scission des carotiprotides. Il s'agit peut-être seulement de

la mort de l'animal ; il reste cependant très probable que la dessiccation de l'embryon en diapause est capable de libérer l'astacène.

5° Le stade embryologique des œufs en diapause est précisément celui qui correspond chez l'embryon vivipare à la libération de l'astacène.

6° Les nauplius issus d'œufs durables sont toujours colorés en jaune, au moins légèrement. De plus nous avons vu que l'élimination d'Hb ne se fait qu'en présence de chlorophylle et par conséquent d'astacène (les caroténoïdes accompagnant toujours la chlorophylle). Donc, nécessairement, l'embryon enfermé dans l'œuf durable renferme de l'astacène et des carotiprotides.

On peut donc supposer que le développement embryonnaire s'accomplit ainsi :

1° Si la femelle ne contient pas d'hémoglobine, les embryons ne sont pas entourés d'une coque épaisse, mais seulement d'une mince enveloppe. Ces embryons contiennent un carotiprotide à base d'astacène qui provient de la nourriture végétale de la mère. Normalement, lorsque le nauplius atteint sa période d'organisation, l'astacène est libéré.

Dans cet essai d'explication d'apparition de la diapause, il faut admettre que la séparation de l'astacène et des protéines est obligatoire pour la poursuite normale du développement ; si les carotiprotides ne sont pas scindés, le développement s'arrête et la diapause s'instaure.

Quel peut être le mécanisme de la scission des carotiprotides ?

On peut supposer que l'embryon n'étant séparé du milieu extérieur (maternel) que par une très fine membrane perméable, il subit des échanges ioniques qui ont pour conséquence la rupture des liaisons astacène-protéines. Le développement se poursuit alors normalement et le nauplius, présentant des mouvements très vifs est rejeté dans le milieu extérieur. On peut dire que la diapause est *virtuelle*.

2° Si la femelle synthétise de l'hémoglobine, les glandes coquillières l'éliminent activement en entourant chaque embryon d'une épaisse coque brune. Ces coques se forment très tôt (elles sont bien formées en début de gastrulation). Épaisses, elles sont imperméables aux ions. Les embryons qui renferment, comme précédemment, des carotiprotides, poursuivent normalement leur développement jusqu'au stade précédant l'organisation du nauplius. A ce moment, normalement, les carotiprotides devraient être scindés : or, les embryons sont séparés du milieu maternel par l'épaisse coque imperméable ; les caro-

tiprotides ne peuvent être scindés ; le développement s'arrête, la diapause s'installe et les œufs (œufs durables) sont rejetés dans le milieu extérieur. Là, exposés à l'air ou à une salinité élevée, ils subissent généralement une déshydratation qui amène la scission des carotiprotides et, par conséquent, permet le développement ultérieur normal de l'embryon.

Ce seraient les protéines libérées et non pas l'astacène qui seraient indispensables à la poursuite du développement.

En effet, nous avons vu que des adultes dépourvus de nourriture verte donnent naissance à des nauplius vivipares parfaitement viables, mais incolores et dépourvus d'astacène. Ces nauplius ne pourraient jamais entrer en diapause, même s'ils étaient entourés d'une coque imperméable ; dans ce cas, les femelles pondraient des œufs bruns mais qui devraient éclore aussitôt.

C'est peut-être le cas des œufs immédiats, mais il faudrait supposer dans ce cas que les embryons sont accidentellement dépourvus d'astacène, alors que les femelles en contiennent nécessairement (nourriture d'algues) ; il est plus raisonnable de supposer que la femelle, très pauvre en hémoglobine, n'entoure que très tardivement l'embryon d'une coque imperméable, alors que la scission des carotiprotides est déjà opérée, ou même que cette coque, par sa minceur, possède encore une certaine perméabilité (Lochhead signale que la coque des œufs immédiats est plus mince que celle des œufs durables).

En interprétant ainsi l'origine de la diapause, je ne prétends évidemment pas en donner une explication définitive, mais seulement proposer un schéma provisoire, simple hypothèse de travail suscitée par mes observations précédentes et pouvant servir elle-même de point de départ à d'autres recherches expérimentales : peut-être l'instauration de la diapause est-elle due au maintien de la combinaison protéines-astacène, peut-être est-elle due au maintien d'une combinaison entre les protéines et un autre corps. Le résultat serait, dans les deux cas, le même, les protéines ainsi « bloquées » ne pouvant participer au développement.

Chapitre VI.

LA RESPIRATION

La consommation d'oxygène est une valeur extrêmement variable dans un organisme tel qu'*Artemia*. Elle peut être influencée :

1° Par les variations de température. Eliassen (31) a trouvé, chez *Artemia* vivant dans le milieu naturel, une diminution de la consommation d'oxygène lorsque la température passe de 14 à 22°, de mars à juin ; cela paraît assez étonnant : peut-être d'autres facteurs intervenaient-ils alors. Grainger (51), en outre, a constaté qu'une variation brutale de la température en plus ou en moins, entraîne une élévation de la consommation d'O_2 pendant les neuf heures qui suivent cette variation. En conséquence, les mesures devront être faites à une température à laquelle les animaux en expérience sont acclimatés depuis au moins 9 heures.

2° Par la surface, c'est-à-dire par la taille du corps (Eliassen, Gilchrist) : il faudra donc choisir des animaux de même taille.

3° Par le sexe (Gilchrist (47, 48)), au moins pour certaines salinités : aux basses salinités, les femelles et les mâles respirent avec la même intensité ; par contre, à haute salinité, les mâles respirent moins intensément que les femelles.

4° Probablement par la quantité d'O_2 mise à la disposition de l'animal par le milieu extérieur ambiant.

5° Par la concentration saline du milieu extérieur valeur d'ailleurs en relation avec la précédente.

6° Par la présence d'hémoglobine dans l'hémolymphe.

J'ai particulièrement étudié la consommation d'O_2 en fonction de la salinité et en fonction de la présence d'hémoglobine. Le quotient respiratoire, mesuré, a donné des valeurs intermédiaires, 0,85 environ, ceci indique une utilisation mixte, des diverses catégories.

1° Consommation d'O_2 en fonction de la salinité chez les mâles.

Pour Kuenen (64), la consommation d'oxygène augmente avec la salinité ; il impute ce fait à la pression osmotique considérablement accrue dans les conditions de l'expérience. Ces mesures portaient sur des concentrations allant de 29 °/₀₀ à 116 °/₀₀, à 25°. Il ne donne pas de précisions sur la taille des animaux étudiés, ni sur leur sexe, bien qu'il les étudie séparément. Les valeurs des mesures sont rapportées au poids frais.

Pour Eliassen, la consommation diminue lorsque la concentration saline augmente de 10 °/₀₀ à 50 °/₀₀. Il ne distingue pas les mâles et les femelles, mais il tient compte de la taille. Les différences dans les résultats de Kuenen et d'Eliassen pourraient s'expliquer par les différences de salinité auxquelles ces auteurs se placent : Kuenen se plaçant à des salinités beaucoup plus élevées qu'Eliassen, on pourrait penser que, par exemple, la régulation osmotique passant par un minimum vers 40 °/₀₀, la consommation d'O_2 soit minimale vers cette concentration. Les mesures sont rapportées au poids d'azote.

Pour Gilchrist, travaillant sur des jeunes femelles de tailles égales, la consommation reste inchangée dans des salinités allant de 35 °/₀₀ à 140 °/₀₀ ; les mesures sont rapportées au poids sec.

Ces trois séries de travaux m'ont amenée à mesurer la consommation d'oxygène en fonction de la concentration saline du milieu ambiant.

Conditions d'expérience.

Les animaux utilisés sont des mâles de taille moyenne (7 à 8 mm) paraissant en bon état. La température est de 29°. Les deux salinités utilisées sont de 53 °/₀₀ et de 122 °/₀₀ en Cl Na. Tous les animaux proviennent d'élevage vivant dans une salinité de 53 °/₀₀. Ceux qui sont destinés à vivre dans une salinité élevée sont placés dans une eau de mer à 53 °/₀₀ à laquelle on ajoute *progressivement* du Cl Na (en 3 ou 4 jours) de façon à obtenir une salinité de 122 °/₀₀ en Cl Na. Les mesures sont faites 20 à 24 heures après que cette salinité ait été obtenue. Mais, dans ce premier travail, je n'ai pas différencié la couleur des animaux (c'est-à-dire la teneur en hémoglobine).

Les mesures sont faites au Warburg, 6 à 7 animaux étant placés dans chaque récipient.

Les résultats sont rapportés au poids frais, plus rapidement mesuré, après séchage sur papier filtre, que le poids sec.

Résultats.

Quand la salinité passe de 53 °/₀₀ à 122 °/₀₀, la consommation passe en moyenne (28 mesures ont été faites) de 97 à 87 mm³/heure/100 mg poids frais.

Donc, ici, la consommation diminue légèrement avec l'augmentation de salinité.

Discussion.

Ces résultats seraient donc en contradiction avec ceux de Kuenen, mais seraient en accord avec ceux d'Eliassen, bien que celui-ci travaille à des salinités bien inférieures.

Ils sont en outre en accord avec le plus récent travail de Gilchrist (48) qui étudie la consommation d'oxygène en fonction du sexe. Pour cet auteur, dans une salinité basse (36 °/₀₀) mâles et femelles respirent avec la même intensité ; mais dans une salinité élevée (140 °/₀₀) alors que les femelles respirent avec la même intensité qu'à 36 °/₀₀, les mâles ont une consommation d'O_2 diminuée.

Il semble donc que la consommation d'O_2 n'augmente pas avec l'augmentation de la concentration saline du milieu extérieur (sauf, sans doute, immédiatement après le changement de la concentration). Quelles conclusions peut-on tirer de cette constatation ?

1° Lorsque la concentration saline du milieu extérieur augmente, la concentration du milieu intérieur d'*Artemia* augmente mais toujours en de moindres proportions : une certaine quantité d'O_2 est donc mobilisée par cette régulation osmotique. De plus, la viscosité du milieu augmentant, la dépense d'énergie musculaire augmente, sauf si l'animal nage beaucoup plus lentement, ce qui entraîne alors un moindre approvisionnement en oxygène (et cela d'autant plus que la concentration d'oxygène est moindre dans des salinités élevées).

Aussi, au niveau cellulaire, l'approvisionnement en O_2 va être plus faible. Nous avons vu qu'une conséquence de cette déficience en oxygène est la synthèse de l'hémoglobine.

2° Cependant, au moins chez la femelle, la consommation d'oxygène globale reste la même malgré la vie dans un milieu raréfié en O_2 :

une substance permet donc l'utilisation de l'oxygène à basse tension : il est naturel de penser à l'hémoglobine.

2° Consommation d'O_2 en fonction de la présence d'hémoglobine et du sexe.

Normalement, si l'hémoglobine joue un rôle dans le transfert de l'oxygène à de basses tensions, on devrait observer que : *a*) si le milieu est riche en oxygène, les animaux ont la même consommation d'O_2 qu'ils soient rouges ou verts ; *b*) que si le milieu est pauvre en oxygène, les animaux pourvus d'hémoglobine ont une consommation supérieure à celle des animaux qui en sont dépourvus. En aucune façon, la présence d'hémoglobine ne devrait correspondre à une diminution de la consommation d'oxygène.

Résultats. — Des mesures effectuées sur des lots d'animaux de sexe et de couleur différents (mâles rouges, mâles verts, femelles rouges, femelles vertes) donnent les résultats suivants :

— animaux rouges (mâles et femelles) : environ 64 mm^3 d'O_2/heure pour 100 mg poids frais ;

— animaux verts (mâles et femelles) : environ 76 mm^3 d'O_2/h/100 mg.

En accord avec le travail de Gilchrist, je n'ai pas observé de différences significatives entre les sexes lorsque l'on mesure la consommation d'oxygène dans un niveau de salinité assez basse (35 °/₀₀ dans le cas de Gilchrist et 53 °/₀₀ dans le mien).

Mais par contre il est très remarquable d'observer *une diminution de la consommation d'oxygène lorsque l'hémoglobine est présente.*

Ce même résultat a été trouvé très récemment par Gravilescu, Dinischiotu et Mihelits (52) travaillant sur des *Artemia* récoltées dans des salines et de couleurs plus ou moins rose ou rouge.

La synthèse de l'hémoglobine a été provoquée par un déficit de l'oxygène dans le milieu ; le pigment, en même temps qu'il permet d'utiliser l'oxygène aux basses tensions, a pour effet, d'ailleurs paradoxal et encore inexpliqué, de réduire la consommation respiratoire ; peut-être ce phénomène est-il dû à une autre substance dont la synthèse ou la destruction est une conséquence du déficit en oxygène.

Rôle du Cytochrome C. — J'ai alors essayé l'action du cytochrome C sur ces animaux.

Placés dans une eau additionnée de 25 mg/100 cm³ de Cyto C, au bout de 6 heures, ils ont une consommation d'O_2 supérieure de 10 mm³ aux animaux témoins placés dans la même eau non additionnée de Cyto C. Au bout de 15 à 20 heures, elle est supérieure de vingt mm³.

Le cytochrome C augmente donc considérablement la respiration (ce qui est normal), même chez les animaux à respiration déficiente. On ne peut cependant pas en conclure que la faible respiration des animaux soit due à un déficit en cyto C, car celui-ci paraît devoir leur être fourni par la levure dont ils sont nourris.

Conclusion. — Nous voyons qu'il est difficile, chez *Artemia* comme chez beaucoup d'autres Invertébrés, de définir le rôle de l'hémoglobine. Celle-ci, synthétisée par suite d'un déficit en O_2, joue-t-elle un rôle dans la consommation d'O_2 ? Il est probable qu'elle n'est utile que lorsque la tension d'O_2 s'abaisse au-dessous d'un point critique et qu'au-dessus de ce point, elle ne joue aucun rôle. Une étude systématique des Hb d'*Artemia*, se heurte malheureusement au fait qu'il est difficile de s'en procurer de grandes quantités.

Par ailleurs, il serait très intéressant d'expliquer la diminution de la consommation d'oxygène que montrent les animaux pourvus d'Hb. Un travail long et très délicat serait certainement à faire, dans lequel toutes les conditions de température, de salinité, de concentration en O_2 et peut-être aussi de pH et de rH, ainsi que la teneur en Hb, la taille et l'âge des animaux seraient très rigoureusement déterminés.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats qui viennent d'être exposés permettent de se faire une représentation assez nette de la reproduction et du développement embryonnaire chez *Artemia salina*.

Les adultes et la ponte.

Les adultes, de race bisexuée ou parthénogénétique, vivent dans des eaux de salinité toujours élevées, mais très variables avec les conditions météorologiques (pluie, température, vent, évaporation). Ils se nourrissent principalement d'algues ; les caroténoïdes qu'ils absorbent

ainsi sont transformés dans leur organisme en un caroténoïde spécifiquement animal, l'*astacène*, et sont stockés sous cette forme. Les élévations de salinité du milieu ambiant, entraînent une élévation appréciable de la concentration ionique de leur milieu intérieur. Une des conséquences de ce phénomène est une élévation des amino-acides libres ; ce phénomène, entraînant une augmentation de la concentration moléculaire intracellulaire, évite une perte d'eau qui serait fatale à l'organisme. Un tel mécanisme de régulation osmotique se retrouve chez d'autres Crustacés poecilosmotiques : Duchateau et Florkin (24) trouvent chez *Eriocheir sinensis* une élévation de l'ensemble du taux des amino-acides ; l'augmentation porte principalement sur la proline ; l'arginine par contre, reste inchangée. Chez l'adulte de l'*Artemia*, il semble que, outre une augmentation générale des amino-acides libres, il y ait une augmentation préférentielle du groupe sérine + glycocolle et une diminution relative de l'alanine. Il est probable que les variations morphologiques observées depuis longtemps chez l'*Artemia*, portant sur la forme de la furca et les longueurs relatives du thorax et de l'abdomen, sont une conséquence de ces modifications biochimiques.

L'élévation de la concentration saline du milieu extérieur entraîne corrélativement une diminution de l'approvisionnement en oxygène. Ici aussi, nous connaissons une des répercussions biochimiques de cette variation des conditions externes : c'est la synthèse de l'hémoglobine. La présence d'hémoglobine joue-t-elle un rôle sur le taux de la consommation d'O_2 ? Il semble que oui ; pour un approvisionnement égal en O_2, les animaux pourvus d'Hb paraissent en consommer moins que ceux qui en sont dépourvus. Si donc une déficience de l'approvisionnement en O_2 (une asphyxie partielle), entraîne la possibilité de synthèse de l'Hb, inversement, celle-ci paraît permettre la survie en présence d'un déficit d'O_2. De plus, sa présence paraît mettre un frein à la consommation d'O_2. Peut-être l'Hb n'est-elle pas directement en jeu, mais sert-elle seulement de témoin, accompagnant la présence ou l'absence d'autres corps ayant un rôle actif dans la respiration cellulaire. Le Cytochrome C, de structure voisine, additionné à l'eau de mer d'élevage, augmente (comme on pouvait s'y attendre dans une certaine mesure), la consommation d'O_2 des animaux à faible intensité respiratoire due à la présence d'Hb.

Une étude plus poussée de la consommation d'O_2 en fonction de

son approvisionnement (et non pas seulement en fonction de la salinité) et de la présence d'Hb, donnerait certainement des résultats intéressants.

Que va devenir cette hémoglobine apparaissant ainsi dans un organisme qui n'en contient normalement pas ? Comment sera-t-elle éliminée ? Chez le mâle, on ne connaît rien de cette élimination ; en fait, elle paraît être très lente : un mâle rouge placé dans un milieu bien oxygéné, ne pâlit que très lentement (plusieurs semaines). La femelle, par contre, élimine l'Hb de son hémolymphe par ses glandes coquillières. C'est seulement une des deux Hb présentes, celle qui possède le poids moléculaire le plus élevé, qui paraît être surtout éliminée de cette façon. Nous avons vu que cette élimination d'Hb est sous la dépendance de la présence d'un ou plusieurs facteurs inconnus, présents dans une nourriture chlorophyllienne, mais absents dans la levure de bière.

Notons que la coque ne paraît pas uniquement formée d'Hb ; protéique, elle en est seulement plus ou moins fortement imprégnée.

L'embryon qui, à partir de l'astacène maternel, a fabriqué des carotiprotides qui lui donnent une couleur gris bleuâtre, se trouve donc entouré, dès la fin du stade blastule, d'une épaisse coque. Cette coque est imperméable aux ions ; seuls l'eau et l'oxygène peuvent la traverser. L'embryon, ainsi pratiquement isolé du milieu maternel, poursuit son développement jusqu'au stade précédant l'organisation du nauplius ; il s'entoure alors d'une fine enveloppe. Arrivé à ce stade, son développement s'arrête. Il est pondu sous cette forme et peut rester ainsi en état de diapause pendant plusieurs mois, peut-être plus, sans que son développement se poursuivre. Seule une déshydratation poussée peut le faire sortir de sa diapause et permet la reprise du développement. Quel est le rôle de la déshydratation ? Il peut être multiple. Le seul qui ait été décelé est la scission des carotiprotides avec libération de l'astacène et des protéines auxquelles il était lié : l'une des molécules libérées est-elle indispensable à la poursuite du développement ? Il est impossible de le savoir actuellement. La seule observation en faveur de cette hypothèse est fournie par l'étude de la femelle vivipare et des nauplius auxquels elle donne naissance.

En effet, lorsque l'approvisionnement en O_2 est suffisant, l'*Artemia* ne synthétise pas l'Hb en quantité notable. La femelle est alors vivipare. Dans le cas où elle renferme de l'astacène, on voit se former dans sa poche ovigère, des embryons de couleur gris-bleuâtre due aux caro-

tiprotides. Au stade d'organisation du nauplius, les embryons prennent une couleur orangée, c'est-à-dire que l'astacène est libéré de sa combinaison protidique. Ce virage de couleur est toujours observé sur les embryons portés par des femelles nourries de caroténoïdes (il peut arriver que l'embryon pourvu d'un excès d'astacène soit coloré en jaune dès les premiers stades).

La scission des carotiprotides paraît donc être une étape du développement ; il est possible qu'elle soit obligatoire et pourrait être à la base de la diapause. On peut supposer que, dans le cas de la viviparité, l'embryon qui n'est entouré que par une fine membrane très probablement perméable, se trouve soumis à des échanges ioniques ou autres, avec le milieu intérieur maternel. Ces échanges ioniques entraîneraient la rupture des liaisons astacène-protéines, permettant par là la poursuite du développement. La diapause serait, dans ce cas, virtuelle.

Dans le cas de l'oviparité, l'embryon se trouve isolé du milieu intérieur maternel par une épaisse coque imperméable aux ions. Dans ce cas, les carotiprotides ne pourraient être scindés, d'où l'apparition de la diapause. La dessiccation, en permettant la rupture des carotiprotides permettrait la poursuite du développement. L'astacène ne jouerait par lui-même aucun rôle directement indispensable dans le développement ; seules les protéines joueraient ce rôle. En effet, les embryons, rigoureusement dépourvus d'astacène poursuivent un développement normal. Dans ce cas, en aucune façon, la diapause ne pourrait exister, même si une épaisse coque entourait l'embryon, l'éclosion aurait lieu dès que le nauplius aurait acquis forme et mouvements. Peut-être est-ce là le cas des œufs immédiats qui éclosent dès qu'ils sont pondus ; cités par différents auteurs, je ne les ai pas moi-même observés dans mes élevages. Il faudrait supposer alors, ou bien que l'élimination de l'Hb se faisant normalement grâce à une nourriture végétale, l'embryon se trouve privé d'astacène, bien que la mère en soit pourvue, ou bien que, l'élimination d'Hb étant peu intense, la coque d'ailleurs peu épaisse et peut-être perméable (Lochhead) ne soit formée que tardivement après la scission des carotiprotides. Il est évident que ce même raisonnement peut être appliqué à n'importe quelle autre substance susceptible de se combiner à des protéides ; l'astacène jouerait alors seulement le rôle d' « indicateur coloré » d'une réaction indispensable.

L'éclosion de l'œuf durable.

Après la rupture de la diapause, l'embryon va continuer son développement. Quelles fractions de ses réserves vitellines vont être de préférence utilisées ?

Tant qu'il reste dans sa coque, les protéines dont il est riche ne subissent pas de variations quantitatives globales ; il en est de même des amino-acides libres qui, eux, sont en faible proportion. C'est seulement au moment de l'éclosion, que l'on assiste à une hydrolyse partielle des protéines, avec élévation du taux des amino-acides libres : elle est accompagnée, semble-t-il, d'une légère augmentation de l'N total ; les amino-acides non protéiques proviendraient, pour une part, de l'hydrolyse des protéines et, pour l'autre part, d'une synthèse à partir des autres constituants de l'embryon. D'après les chromatogrammes, tous les amino-acides, en particulier la proline, subiraient une augmentation de leur taux, sauf le groupe mal séparé des acides cystéique et aspartique, dont l'ensemble resterait stationnaire ou diminuerait.

Cette élévation du taux des amino-acides libres peut être due à des causes métaboliques intrinsèques, telles qu'un remaniement profond des constituants embryonnaires au moment du passage de la vie embryonnaire à la vie larvaire. Mais elle peut être due également à l'augmentation brutale de la concentration ionique du milieu extérieur ; le phénomène serait alors semblable à celui observé chez l'adulte : une étude du taux des amino-acides libres chez le nauplius en fonction de la salinité du milieu extérieur dans lequel ils éclosent, montre en effet une élévation de leur taux (faible il est vrai, et seulement pour une concentration proche de celle à partir de laquelle les œufs ne peuvent plus éclore). Une modification qualitative des amino-acides différente de celle observée chez les adultes, serait en faveur de la première hypothèse. Peut-être les deux phénomènes interviennent-ils.

Les glucides représentent une réserve importante. Il faut distinguer d'une part le glycogène et, d'autre part, le tréhalose, holoside qui, jusqu'à présent n'avait été rencontré que dans le règne végétal, mais que des travaux très récents commencent à mettre en évidence chez les Invertébrés où il doit avoir une large répartition et un rôle important. Chez *Artemia*, le tréhalose est utilisé au cours de l'embryogénèse, tout au moins entre la diapause et l'éclosion. Le nauplius à l'éclosion n'en contient presque plus. C'est l'utilisation de ce glucide qui donne à l'œuf

en immersion son Q. R. égal à l'unité. Le glycogène qui ne représente qu'un très faible pourcentage des réserves glucidiques, n'est pas utilisé : bien au contraire, il est synthétisé en petites quantités, probablement à partir du tréhalose, de sorte que le nauplius à l'éclosion en est plus riche que l'embryon en diapause.

Les lipides qui constituent une réserve importante ne sont pas utilisés avant l'éclosion ; on observe plutôt une légère augmentation de leur taux. Ils ne seront utilisés qu'après l'éclosion, lorsque les réserves de tréhalose auront été épuisées. Le Q. R. tombe alors brutalement à 0,7 environ. Au cours du développement ultérieur, le taux des lipides atteint rapidement le taux caractéristique des adultes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'École d'Urbani sur l'activité enzymatique au moment de l'éclosion.

Artemia peut être considérée comme un exemple de l'influence du milieu extérieur sur l'organisme animal. Si nous considérons une espèce déterminée d'*Artemia* (diploïde bisexuée de Californie par exemple), nous voyons que la forme et la couleur, le mode de reproduction et l'avenir de l'embryon sont directement et fortement influencés par le milieu extérieur. L'animal rouge vif qui pond des œufs durables en diapause est assez différent de l'animal incolore qui se reproduit par viviparité ; si on les considère de plus près, on voit que les uns respirent plus abondamment que les autres, que certains ont un organisme plus riche en ions, en acides aminés ou en pigments protéiques. Le milieu extérieur « modèle » donc l'organisme de l'*Artemia*, mais de telle façon que la survie est encore possible.

Cette diversité, réversible, dans la composition de l'organisme, se retrouve, mais irréversible, dans les caractères génétiques de l'espèce ; nous avons vu dans l'introduction que le nombre de chromosomes était très variable d'une population à l'autre ainsi que les caractères de bisexualité et de parthénogénèse ; rappelons d'ailleurs que chez un Crustacé voisin, la Daphnie, un même individu peut présenter alternativement la bisexualité et la parthénogénèse, ce qui n'est plus le cas chez *Artemia*.

Cette grande dépendance d'*Artemia*, vis à vis du milieu extérieur, lui confère paradoxalement, à la fois une grande variabilité (dans les détails de faible amplitude) et une grande stabilité et résistance comme paraît le montrer sa survie depuis l'oligocène, d'une part, et sa survie dans des milieux fort différents les uns des autres, d'autre part.

BIBLIOGRAPHIE

(1) **1905 à 1935.** Artom (C.). — Consulter les références du traité de Kukenthal et les travaux de Barigozzi.

(2) **1936.** Baas Becking (L. G. M.), Karstens (W. K. H.), Kanner (M.). — Salzeffekte und Milieu bei *Artemia salina* nebst Bemerkungen über Ionenantagonism. *Protoplasma*, **25**, pp. 32-40.

(3) **1939.** Barigozzi (C.). — La biologia di *Artemia salina* in aquario. *Atti Soc. ital. Sc. nat.*, **78** (2), 136-64.

(4) **1957.** Barigozzi (C.). — Différenciation des génotypes et distribution géographique d'*Artemia salina* (L.) ; données et problèmes. *Année biol.*, **33**, n° 5-6, pp. 241-50.

(5) **1950.** Becquerel (P.). — Suspension de la vie au-dessous de 1/20° K absolu par démagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plus élevé. *C. R. Ac. Sc.*, **231**, 261, et travaux de 1936 à 1950.

(6) **1957.** Bellini (L.). — Studio delle proteinasi e dipeptidasi nelle sviluppo di *Artemia salina*. *Atti Accad. nazion. Lincei*, R. C. cl. sc. fis. mat. nat., Italia, **22**, n° 3, pp. 340-46.

(7) **1957.** Bellini (L.). — Studio delle amilasi nello sviluppo di *Artemia salina*. *Atti Accad. nazion. Lincei*, R. C. cl. sc. fis. mat. nat. Italia, **23**, n° 5, p. 303-7.

(8) **1958.** Bellini (L.)., Lavizzari (G. S.). — Studio delle lipasi nello sviluppo di *Artemia salina*. *Atti Accad. nazion. Lincei*, R. C. cl. sc. fis. mat. nat., Italia, **24**, n° 1 pp. 92-5.

(9) **1931.** Boone (E.) et Baas Becking (L. G. M.). — Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina*. *J. gen. physiol.*, **14**, pp. 753-63.

(10) **1893.** Bourquelot (E.). — Sur la tréhalase. *C. R. Ac. Sc.*, **116**, 826 et *Soc. de Biol.*, **45**, 425.

(11) **1895.** Bourquelot (E). et Gley (E). — L'action du sérum sanguin et de l'urine sur le tréhalose. *Soc. de Biol.*, **47**, 515.

(12) **1904.** Bourquelot (E.) et Herissey (H.). — Sur la tréhalase. *Soc. de Biol.*, **57**, 409.

(13) **1905.** — Sur la tréhalase. *Bull. Soc. mycol.*, **21**, 1.

(14) **1893.** Brauer (A.). — Zur Kenntnis des Reifungs der parthenogenetisch sich entwickelnden Eier von *Artemia salina*. *Arch. f. Mikr. Anat.*, **43**, 62, 216.

(15) **1957.** Burriel-Marti (F.), Ramirez-Munoz (J.). — Flame Photometry. Elsevier P. C.

(16) **1958** *a*. Croghan (P. C.). — The mecanism of osmotic regulation in *Artemia salina ;* the physiology of the branchiae. *J. exp. biol.*, **35**, n° 1 pp. 234-42.

(17) **1958** *b*. — The mecanism of osmotic regulation in *Artemia salina ;* the physiology of the gut. *J. exp. biol.*, **35**, n° 1 pp. 243-49.

(18) **1958** *c*. — The survival of *Artemia salina* in various media. *J. exp. biol.*, **35**, p. 213.

(19) **1958** *d.* — The osmotic and ionic regulation in *Artemia*. *J. exp. biol.*, **35**, p. 219.

(20) **1958** *e.* — Ionic fluxes in *Artemia*. *J. exp. biol.*, **35**, n° 2, p. 425.

(21) **1928.** Dawidoff (C.). — Traité d'embryologie comparée des Invertébrés. Paris, Masson.

(22) **1952.** Dixon (M.). — Manometric methods. Cambridge U. P.

(23) **1948.** Dresel (E. I. B.). — Passage of haemoglobin from blood into eggs of *Daphnia*. *Nature*, **162**, 736.

(24) **1956.** Duchateau (G.), Florkin (M.). — Système intracellulaire d'acides aminés libres et osmorégulation des Crustacés. *J. Physiol.*, **48**, n° 3 p. 520.

(25) **1958.** Duchateau (G.), Florkin (M.), Gromadska (M.). — Tréhalosémie du ver à soie. *Arch. inter. Physiol. Bioch.*, **66**, n° 3 pp. 434-35.

(26) **1951.** Durchon (M.), Lafon (M.). — Quelques données biochimiques sur les Annélides. *Ann. Sc. nat., Zool.*, 11e série ; **13**, 427-52.

(27) **1956.** Dutrieu (J.). — L'œuf durable d'*Artemia salina* L. ; conditions de vie et composition chimique. *C. R. Ac. sc.*, **243**, p. 98.

(28) **1957.** — Modifications chimiques accompagnant le développement embryonnaire d'*Artemia salina*. *C. R. Ac. sc.*, **244**, p. 2650.

(29) **1959** *a.* — Présence de tréhalose dans l'œuf durable d'*Artemia salina*. *C. R. Ac. Sc.*, **248**, p. 1038.

(30) **1959** *b.* — Les pigments d'*Artemia salina* L. : rapport entre la nature des pigments et le mode de reproduction des adultes. *C. R. Ac. Sc.*, **248**, p. 2522.

(31) **1952.** Eliassen (E.). — The energy metabolism of *Artemia salina* in relation to body size, seasoned rythms and different salinity. *Univ. Bergen Naturvitenskapeligrekke*, n° 1, 1-18.

(32) **1958** *a.* Fairbairn (D.). — Glucose, tréhalose and glycogen in *Porocaecum decipiens* larvae. *Nature*, **181**, n° 4623, pp. 1593-94.

(33) **1958** *b.* — Trehalose and glucose in Helminths and other Invertebrates. *Canad. J. Zool.*, **36**, n° 5, pp. 787-95.

(34) **1957.** Fairbairn (D.), Passey (R. F.). — Occurence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lombricoides*. *Exp. Parasitol.*, **6**, n° 6 pp. 566-74.

(35) **1951.** Fautrez-Firlefyn (N.). — Etude cytochimique des acides nucleiques au cours de la gamétogénèse et des premiers stades d'*Artemia salina*. *Arch. biol.*, **62**, pp. 391-438.

(36) **1953.** — Intranuclear proteins of the oocytes in *Artemia salina*. *Nature*, **172**, pp. 163-64.

(37) **1954.** — La metachromasie in vivo au bleu de toluïdine dans le spermatozoïde d'*Artemia salina*. *Bull. Micros. appl.*, 2e série **4**, n° 9-10, pp. 105-112.

(38) **1957.** — Protéines, lipides et glucides dans l'œuf d'*Artemia salina*. *Arch. biol.*, **68**, n° 2 249-94.

(39) **1896.** Fischer, Niebel. — Sitzungsberichte der Preuss. Akad. Wissensch. 79. (cité par Willstaedt, Borggard (109)).

(40) **1948.** Fox (H. M.). — The haemoglobin of *Daphnia*. *Proc. Roy. Soc.*, B., **135**, p. 195.

(41) **1949.** — Haemoglobin in Crustacea. *Nature*, **164**, 59.

(42) **1953.** Fox (H. M.), Phear (E. A.). — Factors influencing haemoglobin synthesis by *Daphnia*. *Proc. Roy. Soc.*, B., **141**, pp. 179-89.

(43) **1939.** Fransemeier (L.). — Zur Frage der Herkunft der Metanauplialen Mesoderms und die Segmentbildung bei *Artemia salina*. *Z. Wissen. Zool.*, A, **152**, pp. 439-72.

(44) **1941.** Frerejacque (M.). — Tréhalose et tréhalase. *C. R. Ac. Sc.*, **213**, 88.

(45) **1922.** Gajewski (N.). — Ueber die Variabilität bei *Artemia salina*. *Inter. rev. Ges. Hydrob. Hydrogr.*, **10**, 139-159.

(46) **1954.** Gilchrist (B.). — Haemoglobin in *Artemia salina*. *Proc. Roy. Soc.*, *B*, **143**, p. 136.

(47) **1956.** — The oxygen consumption of *Artemia salina* in different salinity. *Hydrobiologia*, **8**, n° 1-2 pp. 54-65.

(48) **1958.** — The oxygen consumption of *Artemia salina*. *Hydrobiologia*, **12**, n° 1, pp. 26-27.

(49) **1952.** Goldsmith (E.). — The variations in chromosom number in *Artemia salina*. *J. of Morph.* **91**, pp. 111-33.

(50) **1933.** Good (C. A), Kramer (H.), Somogyi (M.). — Journ. bioch. chem. 100, 485. (cité par Loiseleur (72)).

(51) **1956.** Grainger (J. N. R.). — Effects of changes of temperature on the respiration of certain Crustacea. *Nature*, **178**, n° 4539 pp. 930-1.

(52) **1957.** Gravilescu (N.)., Dinischiotu (L.), Mihelits (R.). — Hemoglobine ca pigment respirator la *Artemia salina*. *Commun. Acad. Rep. pop. rom.*, n° 12 (7), pp. 1041-45.

(53) **1955.** Green (J.). — Haemoglobin in the fat cells of *Daphnia magna*. *Quart. J. micr. Sc.*, **96**, 173.

(54) **1956.** — Variation in the haemoglobin contents of *Daphnia pulex*. *Proc. Roy. Soc.*, B, **145**, n° 919 pp. 214-32.

(55) **1924.** Greene (C. W.). — The circulatory system of the brine shrimp. *Science* (n. s.), **60**, 411-12.

(56) **1936.** Gross (F.). — Die Reifung und Furchungstellungen von *Artemia salina* in Zusammenhang mit dem Problem der Kernsteilungsmechanismus. *Zeit. Zellforsch. Microsk. anat.*, **23**, pp. 522-67.

(57) **1953.** Guichard (C.). — Contribution à l'étude des glucides de la vigne. Thèse doct. ès sc. nat. Bordeaux.

(58) **1956.** Horstmann (H. J.). — Der Lipidgehalt der Embryonen von *Lymnaea stagnalis*. L. während ihrer Entwickelung. *Biochem. Z. Dtsch.*, **328**, n° 5, 348-51.

(59) **1956.** Howden (G. F.), Kilby (B. A.). — Trehalose and trehalase in the Locust (*Schistocerca gregaria*). *Chem. and Ind.* (8 déc.) p. 1453.

(60) **1933.** Jacobi (E. F.), Baas Becking (L. G. M.). — Salt antagonism and effect of concentration in nauplius of *Artemia salina*. *Tidschrift Ned. Land. Dierk. Ver.*, série 3, **3**, 145-53.

(61) **1941.** Jennings (R. H.), Whitaker (D. M.). — The effect of salinity upon the rate of excystment of *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, **80**, 194-201.

(62) **1840.** Joly (N.). Histoire d'un petit crustacé, *Artemia salina*, auquel on a faussement attribué la couleur rouge des marais salants méditerranéens, suivie de recherches sur la cause réelle de cette coloration. *Ann. Sc. nat., Zool.*, série 2, **13**, 225-90.

(63) **1950.** Karrer (P.), Jucker (E.). — Carotenoids. Elsevier P. C.

(64) **1939.** Kuenen (D. J.). — Systematical and physiological notes on the brine shrimp, *Artemia salina*. *Arch. Neerl. Zool.*, **3**, 365-449.

(65) **1936.** Kukenthal (W.). — Handbuch der Zoologie. Berlin. W. de Gruyter.

(66) **1937.** Kuwana. — Jap. J. Zool., **7**, p. 273. (Cité par Wyatt, Kalf (111)).

(67) **1938.** Lederer (E.). — Recherches sur les caroténoïdes des animaux inférieurs et des Cryptogames. Thèse doct. sc. nat., Paris.

(68) **1957.** Lederer (E.), Lederer (M.). — Chromatography. Elsevier P. C

(69) **1941.** Lochhead (J.). — Artemia, the « brine shrimp ». Turtox News. vol. 19, n° 2.

(70) **1940.** Lochhead (J.), Lochhead (M.). — The eggs shells of the brine shrimp *Artemia*. *Anat. Rec.*, **78**, suppl., 75-6.

(71) **1941.** — Studies on the blood and related tissues in *Artemia salina*. *J. Morph.*, **68**, 593.

(72) **1954.** Loiseleur (J.). — Techniques de laboratoire. Masson. Paris.

(73) **1943.** Macheboeuf (M.), Delsal (L.). — Bull soc. chim. biol., **25**, 116.

(74) **1921.** Martin (E. G.), Wilbur (B. C.). — Salt antagonism in *Artemia*. *Am. J. physiol.*, **55**, 290-91.

(75) **1937.** Mathias (L.). — Biologie des Crustacés Phyllopodes. *Act. Sc. ind.*, Paris.

(76) **1927.** Medwedewa (N. B.). — Ueber der osmotische Druck der Haemolymph von *Artemia salina*. *Z. Vergl. Physiol.* 5 ; 547-54.

(77) **1949.** Myrback (K.). — Trehalose und trehalase. *Ergeb. Enzymforsch.*, vol. **10**, pp. 169-190.

(78) **1935.** Naumann (E.). — Ueber Massenzucht von *Artemia*. *Intern. rev. ges. Hydrob. Hydrogr.*, **32**, 313-18.

(79) **1931.** Needham (J.). — Chemical embryology. Cambridge U. P.

(80) **1930.** Needham (J.), Needham (D.). — On phosphorus metabolism in embryonic life (I. Invertebrates eggs). *Br. Journ. of exp. Biol.*, vol. **7**, n° 4 pp. 317-48.

(81) **1930.** Nicloux (M.). — Dosage de l'oxygène dissous dans l'eau de différentes origines : eau de mer, eau douce. *Bull. Soc. biol.*, **12**, p. 1326.

(82) **1957.** Passey (R. F.), Fairbairn (D.). — The conversion of fat to carbohydrates during embryonation of Ascaris eggs. *Canad. J. biol. physiol.*, **35**, n° 7, pp. 511-25.

(83) **1836.** Payen (C. L.). — Note sur des animaux qui colorent en rouge les marais salants. *Ann. Sc. nat.*, Zool., 2e série, **6**, pp. 219-25.

(84). **1955.** Plattner (F.). — Der osmotische Druck von *Artemia salina*. *Pflüg. Arch. Ges. Physiol.*, **261**, 172.

(85) **1942.** Prosser (C. L.). — Uptake of dyes by *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, **83**, 145-64.

(86) **1950.** — Comparative animal physiology. Saunders C1e.

(87) **1932.** Seifert (R.). — Raumorientierung und Phototaxis des Anostraken Euphyllopoden (Versuche am *Chirocephalus* und *Artemia*). *Z. vergl. Physiol.*, **16**, 111-184.

(88) **1934.** — Ueber der Verlauf der Helladaptation bei *Artemia salina*. *Verh. Deutsche. Zool. Ges.*, **36** (*Zool. Anz., Suppl.* Bd **7**), 224-28.

(89) **1875.** Smankewitsch (W. L.). — Ueber das Verhältnis des *Artemia salina* Miln-Edw. zur *Artemia Muhlhauseni* Miln-Edw. und dem Genus *Branchipus* Schaeff. *Z. Wissen. Zool.*, suppl. 25, 103-116.

(90) **1877.** — Zur Kenntnis der Einfluss der ausseren Lebenbedingung auf die Organisation der Tiere. *Z. wissen. Zool.*, **29**, 429-94.

(91) **1954.** Smaridge (M. W.). — Iron excretion by *Daphnia* during haemoglobin loss. *Nature*, **173**, p. 782.

(92) **1957.** — Distribution of iron in Daphnia in relation to haemoglobin synthesis and breakdown. *Quart. J. Micr. Sc.*, 97, n° 2, pp. 205-14.

(93) **1956.** Sparrow (B. W.), Corner (E. D. S.). — The mode of action of toxic agents. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **35**, n° 3, pp. 531-48.

(94) **1932.** Teissier (G.). — Origine et nature du pigment caroténoide des œufs de *Daphnia pulex*. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 813.

(95) **1956.** Tha Myint. — New details of excystment of *Artemia salina*. *Proc. Louisiana Acad. Sc.*, **19**, 24-8.

(96) **1935.** Thivolle (L.). — Méthode de microdosage de l'acide phosphorique. Application au dosage du phosphore dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **17**, 1427.

(97) **1957.** Umbreit (W. W.), Burris (R. H.), Stauffer (J. F.). — Manometric technics. Burgess, P. C.

(98) **1952.** Urbani (E.), Rognone (L.), Russo (S.). — Osservazione sulla vita latente : I. Studia del dipeptidasi di *Artemia salina*. *Atti Accad. naz. Lincei*, R. C. Cl. Sc. fis. mat nat., **23**, fasc. 5, pp. 300-308.

(99) **1953.** Urbani (E.), de Cesaris Coromaldi (L.). — Osservazione sulla vita latente : II. Studia del proteinasi di *Artemia salina*. *Atti Accad. naz. Lincei R. C.*, Cl. Sc. fis. mat. nat., **14**, n° 1, pp. 144-9.

(100) **1953.** Urbani (E.), Russo (S.), Rognone (L.). — Osservazione sulla vita latente : III. Studio delle amilasi di *Artemia salina*. *Atti Accad. naz. Lincei R. C.* ,Cl. Sc. fis. mat. nat., **14**, n° 5, 697-701.

(101) **1957.** Urbani (E.). — Studi di embryologia e zoologia chimica degli Anfibi. *Ist. Lomb. sc. e let., R.* C. Cl. Sc., B., n° 92, pp. 69-179.

(102) **1958.** Urbani (E), Bellini (L.). — Studio delle ribonucleasi acida nelle sviluppo di *Artemia salina*. *Atti Accad. naz. Lincei*, R. C. Cl. Sc. fis. mat. nat., **25**, n° 3-4, pp. 198-201.

(103) **1921.** Verne (J.). — Pigments tégumentaires des Crustacés décapodes : introduction à l'étude histochimique des pigments animaux. Paris.

(104) **1923.** — Les pigments rouges et la formation d'hémoglobine chez les Daphnies. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **48**, pp. 140-44.

(105) **1924.** — Hémoglobine et chlorophylle ; hypothèse de travail sur les rapports histobiologiques des deux pigments. *Bull. soc. Zool. Fr.*, **11**, p. 526.

(106) **1938.** Warren (H.), Kuenen (D.), Baas Becking (L. G. M.). — On the relation between internal and external medium in *Artemia salina*. *Proc. Kon. Nederl. Akad. v. Wetenschappen*, **41**, n° 6-10, p. 873.

(107) **1947.** Weisz (P.). — The histological pattern of metameric development of *Artemia salina*. *J. of Morph.*, **81** (1), 45-89.

(108) **1940.** Whitaker (D. M.). — The tolerance of *Artemia* cysts for cold and higher vacuum. *J. exp. Zool.*, **83**, pp. 391-99.

(109) **1946.** Willstaedt (H.), Borggard (M.). — Sur la tréhalase. *Akad. Kem. Miner. Geol.*, **23**, B, n° 1.

(110) **1956.** Wubderly (C.). — Electrophorèse sur papier. Vigot, Paris.

(111) **1956.** Wyatt (G. R.) et Kalf (G. F.). — Trehalose in Insects. *Feder. proc. U. S. A.*, vol. **15**, n° 1 (1), p. 388.

(112) **1956.** Wyatt (G. R.), Loughheed (T. C.), Wyatt (S. S.). — The chemistry of Insect haemolymph of the silkworm *Bombyx mori*, and two other species. *J. gen. physiol.*, **39**, 853.

De nombreuses références peuvent être trouvées dans le traité de Kukenthal et les travaux de Barigozzi, Kuenen, Lochhead et Mathias.

ABBEVILLE. — IMPRIMERIE F. PAILLART (D. 7397). — 1960.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

Les Ectohormones.

Vu et approuvé :

Bordeaux, le 3 décembre 1959.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

BRUS

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le 4 décembre 1959.

LE RECTEUR,
PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

E. DELAGE